50376 1981 50376 1981 17

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

par

Mekinto BATCHO

CASTRATION PARASITAIRE DE Silene alba (Miller) E.H.L. Krause ET S. dioïca (L.) Clairv. par Ustilago violacea (Pers.) Rouss.



Soutenue le 30 Janvier 1981, devant la commission d'Examen

- R. BOURIQUET
- M. FAVRE-DUCHARTRE
- R. GAUTHERET
- C. PAUPARDIN
- C. ZAMBETTAKIS

R E M E R C I E M E N T S

Ce travail a été réalisé au laboratoire de physiologie végétale, sous la direction de Monsieur le professeur BOURIQUET.

Je suis arrivé dans son laboratoire en Octobre I972 à titre étranger, et lorsqu'il m'a proposé ce sujet, j'ai eu à exprimer une réaction qui indiquait l'inquiétude qui m'envahit quant à l'aboutissement du travail. Il me fit alors comprendre qu'il avait hérité d'une formule de son directeur de recherche et aui était la suivante : "Il n'y a pas de mauvais thèmes de recherches, il n'y a que de mauvais chercheurs". Sur ce, tout au long des huit années qu'a duré ce travail, il n'a pas ménagé sa peine ni son temps pour me suivre. Il m'a constamment encouragé, soutenu, défendu, guidé, et malgré les nombreuses charges au'il assumait alors, il lui arrivait souvent de me consacrer près de deux heures pour faire le point.

Il m'a envoyé en stage dans de nombreux laboratoires (Museum National d'Histoire Naturelle, Centre National de Recherche Agronomique, Laboratoire de Biologie végétale d'Orléans et de Reims). Entre-temps, il me fit nommer Assistant, puis Maître-Assistant pendant quatre ans à la Faculté de Sciences de Lille I, puis actuellement, Maître-assistant des disciplines pharmaceutiques à la Faculté de Pharmacie de Lille II.

Il est évident que ce travail aurait sûrement pu être plus complet et plus important si j'avais suivi toutes ses directives.

Pour tout ce qu'il a fait pour moi, je voudrais qu'il trouve ici l'expression de ma très profonde et sincère gratitude.

Monsieur le professeur R. BOURIQUET développe un effort considérable pour la formation des chercheurs des pays du tiers monde (Afrique Noire, Afrique du Nord, Asie, Amérique latine) et, ce, au prix de certaines susceptibilités. Je me permets, en tant que celui des étrangers qui a le plus duré dans son laboratoire, et avant qu'une organisation internationale des pays en voie de développement le fasse un jour, le féliciter pour son courage et sa générosité.

Ce travail a été aussi réalisé en partie au Laboratoire de Botanique de l'Université de Reims, sous la direction du Professeur FAVRE-DUCHARTRE qui m'a accueilli avec beaucoup de bienveillance. Il m'a aidé par les discussions qu'il m'a accordées et les conseils qu'il m'a donnés. Je rappelle que la totalité

.../

des observations en microscopie électronique a été faite dans son laboratoire. Il n'a pas ménagé son temps pour lire et corriger ce manuscrit, et je suis très honoré et très reconnaissant qu'il ait accepté de juger ce travail.

J'exprime mes remerciements à Monsieur ZAMBETTIS, Maître de recherche au C.N.R.S., dont la grande connaissance des Ustilaginales m'a été indispensable tout au long de ce travail. Les planches photographiques de cette thèse ont été tirées grâce à l-aide financière du Laboratoire de Cryptogamie du Museum National d'Histoire Naturelle sur proposition de Monsieur Ch. ZAMBETTAKIS ; je lui en suis très reconnaissant,

 J^{r} exprime aussi ma reconnaissance à Mademoiselle C. PAUPARDIN, professeur, qui m-rhonore en acceptant de participer à ce jury.

Je tiens à remercier Monsieur le professeur R. GAUTHERET qui, malgré les charges que lui impose la présidence de l'Académie des Sciences, me fait l'honneur de juger ce travail.

Je voudrais aussi remercier trois personnes qui m'ont beaucoup apporté pour ce travail : il s'agit de Monsieur Jean DUBOIS, Maître-assistant, avec qui j'ai fait mes débuts de recherches et qui m'a aidé au commencement de ce travail.

Monsieur Raymond JEAN, Maître-assistant qui m'a initié à la Cytologie, et Monsieur Jean-Claude AUDRAN, Maître-assistant, dont la compétence et l'intensité de travail m'ont permis de terminer ce travail. Je lui dois toutes les observations en microscopie électronique.

Je voudrais aussi que Monsieur Jean-François BOUSQUET, attaché de recherche au C.N.R.A., accepte mes remerciements pour tout ce qu'il m'a appris au cours des stages que j'ai effectués dans son laboratoire.

Je suis arrivé en France au cours de l'année universitaire I968-I969, et cela fait beaucoup de rester I3 ans loin de chez soi, dans un milieu dont le degré de développement pousse à l'individualisme. Je voudrais très sincèrement exprimer toute ma gratitude à quatre familles qui m'ont aidé à supporter les durs moments que m'a imposé ce long séjour.

Il s'agit de la famille DECOMBLE de Bapaume, DUBOIS-TYLSKI de Wanehein, BOLLENBERG de La Madeleine et COPPINS de Pont-à-Marcq. J'espère un jour leur faire vivre l'hospitalité de mon pays.

.../...

.../

Je remercie Mademoiselle D. COUSTAUT, professeur à la Faculté de pharmacie, de m'avoir bien accueilli dans son laboratoire pour assurer l'enseignement des travaux pratiques aux étudiants de la 2ème année de pharmacie.

Que mes collègues de laboratoire : S. RAMBOUR, J. VASSEUR, J. DUBOIS, J.P. COUILLEROT, H. MORVAN, soient remerciés pour les bons moments que nous avons passés ensemble.

Je remercie enfin Madame CAQUANT Danièle pour avoir assuré avec patience la frappe de ce travail, et toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont aidé. Soyez assurés de ma profonde gratitude.

-=-=-=-

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I - HISTORIQUE

A)	INT	rr(DDI	U C	T	ΙC	N																•														1(
В)	BIO) L () G	ΙE		DU		CI	H A	M	Ρ]	[G	N	0	N	:																					
	a)	Су	7 C .	1 e	: (d e		ď	é v	e	1 c	эp	p	eı	m e	e n	t	(d'	U	s	t	i	1 á	3 E	; 0		ν	j.	0	1 a	a (e e	: a	. •		I
	b)	Ge	eri	ni	n.	a t	i	01	n	d	e s	3	t	é	1 :	i. 0	S	р	o r	: e	s									•		•		•	•		I 2
	c)	Fo	rı	na	t	io	n	Ó	d e	s	ć	li	c	a:	ry	7 0	n	S														• (•		•	ΙV
	d)	Му	7 C (é 1	i	um	l	d:	i c	a	ry	70	t	i	qι	ı e		•		•	•	•		•		•	•	•		•				•	•		I 2
C)	BIO et) L (S)	G [I E	E	D E	I	S :	I L	E A	N E		<u>A</u>	L!)	B <i>F</i>	\ JL	() A	M I i	I L	_ L	. E	R)		<u>.</u> .	H •		L •		•	K F	₹,	۱U	\S •	E	•	15
D)	МОГ	 E	D	' I	NI	- E	С	Τ:	1 0	-N	F	Ą	R	1	LE	S		U:	5 7	I	L	Α	G (2	:												
	a)	Ιr	ı E e	e C	t	i o	n	1	ра	r	1	l e	s	;	g 1	а	í	n (9 5	3						•											17
	ъ)	Ir	ıf.	e c	t:	i o	n	1	ра	r	1	le	s]	p 1	. a	n	t١	1 د	. е	: S			. ,					•								1.7
	c)	Ιr	nfe	e c	t.	io	n	I	ра	r	1	e	s		ſ]	. e	u	rs	S																	•	18
	d)	Ir	nf	e c	t:	i. o	n	I	ра	r	1	e	s	1	b c	u	r	g (e c	n	s		•		•		•	•						•			18
Ε)	MOI CH <i>A</i>) I F \MF) I (C A G N	T 01	И I О	M •	S		10	RF	•	<u>ا</u> ن	L •	00	3 I	n •	Մ! •	F_(5	P	R	n'	. ·)() (E	F. •	S	•	Ρ,	Ą ;	? •	L ·	. F.	•	I 9
F)	FAC	TE	UI	RS	ı	H 0	R	М(N C	ΑΙ	U)	(:																								
	a)	Αc	t:	i o	n	d	e	S	h	0:	rn	n O	n	e	s	s	e:	χı	ı€	<u>1</u>	1	e	s	á	a m	i	m	a	1	e:	S					•	20
	ъ)		0 C																															e)	,	
			ac:																																		2 I

. . / . . .

CHAPITRE II - MATERIEL ET TECHNIQUES

A)	CHO	01>	([) E	S	M	ΙL	. 1	П	JX		D E	-	С	U١	_ T	U	R	E	•		•		٠						•	·•		•	2/
B)	ME RE(TH(DE Te	E	D' S	E D	T L A !	ID IS	E L	D A	E	L N A	A T	U	G F R F	E P	•	Ι.	N A	T .	1	10	· •	D •	E :	S • •	T	E !	L]	0	S	P •	ORES •	2 !
C)	ME DAI										Έ(27	I	0	Ν	D	Ε	S	T	Έ	L	Ι(S	P	01	R E	S		R E	E C	0	L	TEES	
	a)	Tr	ai	Ιt	e m	ie:	n t	: (d e	e s	1	o C	u	t	οr	n s		f	1 c	r	a i	u 2	ζ					•		•	•	•	•	26
	ъ)	D€	si	n	fе	. C	ti	.0	n	d	es	3	t	é	1 i	ĹΟ	s	р	or	e	s				•	٠.	•	•		•	•	•	•	26
D)	MET DE	ГНС <u>S I</u>	DE	N	D E E	A	C U	L	Tl	JR	Ē			Ε.	P 7	ſI	Q ·	U!	Ε	D ·	E :	S • •	P	L.	A 1	۷Τ	E	s •		N	T	Ι.	ERES	27
E)	MET TIC																																RASIT	ES
	a)	P 1	ar	ıt	e s		s a	iı	n e	e s						•		•	٠.	•	•				•		•	•			•	•		27
	ъ)	P 1	ar	t	e s]	p a	r	a s	i	té	é e	s			•		•		•			•		•			•	٠.	•	•		•.	28
F)	CUL																																	
	a)	Ιs	01	. e1	m e	n	t	d (e s	3	c :	lô	'n	e	S			•		•	•	٠.	•	•	•			•		•	•	•	•	29
	ъ)	Dé	te	rı	mí	na	a t	i	or	1	d e	9	1	a	c	0	m	рā	a t	i	b:	i]	i	t	é	•		•			•		•	30
G)	MET CLO DE	NE	S	C	011	P	TP	I	BL	. E	S	E	T		D'	U	N	E	\$	0	U (C I	ΙE		DE	:	L	Α		iΥ	C	0.	DEUX THEQU •	E 30
Н)	MET DES	047 T	DE	S	D E U S	(CU IS	01	T L	JR ES	E	S E	I	M S_	U L I L	. T	A N	N I	E E	L	DI R	U	C	H.	A 1	1P	Ι.	G I) N		Ε΄	T •	3 I
I)	MET DES PRO VIO	S P OTE	RC	T U	E I E S	N	ES DA	N:	E T S	T U	D E N	E S	I	A ! L	C I	D R A	E	S I	A D E	M	II Cl	N E	S T	U	L: RI	I B	R D	E :	S J S	E	T	_	<u>A G O</u>	32
J)	MET	гно	DE		D'	I	ΝF	Έ(СТ	Ī	10	V	Ε	X	PE	R	Ι	M	ΕN	T	ΑΙ	LE	-	:										
	a)	Pr	ép	a	ra	t:	i o	n	d	l e	s	i	n	0	c u	ı 1	u	m s	5				•					•	• •		•			34
	ь)																																	
			1																															35
			1																															35
		3)	1	е.	S	\mathbf{r}	o s	e 1	t t	6	S																	•		•	٠	٠		3.5

)	PPR	TERIEL ET HETHODES DE CTTOLOGIE ;	
	a)	Techniques de microscopie optique	36
	b)	Mise en évidence du mycélium dicaryotique	
		dans les tissus de l'hôte	38
	c)	Test de Brachet	39
	d)	Mise en évidence des polysaccharides :	
		I) Réaction de Schiff (P.A.S.)	39
		2) Bleu alcian	40
		3) Chloroiodure de zinc	4 I
		4) Test au phloroglucinol	4 I
		5) Bleu aniline	4 <u>I</u>
		6) Lugol	42
		7) Rouge de ruthénium	42
	e)	Mise en évidence des lipides :	
		I) Bleu de Nil	42
		2) Noir soudan	42
		3) Bleu de luxol	43
	f)	Détermination des réserves protéiques	
	- /	(la ninhydrine)	43
		(1a nimiyuline)	
	g)	Microscopie électronique à transmission :	
		I) Fixation	44
		2) Post-fixation	44
		3) Préparation du tampon et déshydratation	45
		4) Bains d'inclusion	46
		5) Test de Thiery (1967)	46
		6) Acétate d'uranyle - citrate de plomb	46
		7) KMn0 ₄	46
		•	
	h)	Méthode de détermination des acides aminés	
		libres à partir de fragments de tige de <u>Silene</u>	A 7
		alba et S. dioica	47

CHAPITRE	II	I - GERMINATION ET ASEPTISATION DES TELIOSPORES D'USTILAGO VIOLACEA .	
	A)	GERMINATION DES TELIOSPORES	4.8
	В)	DESINFECTION DES TELIOSPORES RECOLTEES DANS LA NATURE	50
CHAPITRE	ΙV	- FLORAISON DE <u>SILENE ALBA</u> ET <u>S.DIOICA</u>	
	A)	CULTURE DES PLANTES ENTIERES :	
		a) en champ	54 54 55
	В)	CULTURE DES FRAGMENTS DE TIGES SAINES DE SILENE ALBA	56
	C)	OBTENTION IN VITRO DE FLEURS DE SILENE ALBA ET S.DIOICA PARASITEES PAR USTILAGO VIOLACEA :	
		a) <u>Silene dioica</u> parasité	59
		b) <u>Silene alba</u> parasité	61
CHAPITRE	٧	- COMPATIBILITE ET CROISSANCE DES SPORIDIES	
	A)	COMPATIBILITE DES SPORIDIES	63
	В)	CROISSANCE DES SPORIDIES SUR DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURES	64
•	C)	IMPORTANCE DE LA SOURCE DE CARBONE	66
	D)	IMPORTANCE DE LA TENEUR EN SACCHAROSE	68
	E)	IMPORTANCE DE LA TENEUR EN VITAMINE BI	68
CHAPITRE	VI	- INFLUENCE DE QUELQUES FACTEURS SUR LA CONJUGAISON DES SPORIDIES COMPATIBLES :	
	A)	CINETIQUE DE LA CONJUGAISON	7 I

	D)	COL																								72
	C)	FA(101	UE	S	C 0	N.	TR	0 L	. A I	ΝT	l	_ A								
		a) ,b)	Te Lu																							7.4 7.5
	D)	FAG	СТЕ	UR	s I	PH'	YS:	101	L O	GΙ	QU	E S	S	:												
	,	a) b)																								76 78
	E)	IMI	O R	ΑT	NCI	E I	DU	C/	ΑR	В0	ΝE	8	EΤ	D	Ε	L	1 /	١Z	0 T	Ε						78
	F)	EFF COI																								8 I
	G)	VAF COI DE	١JU	GU	ΕR	DI	ES	SI	P 0	RΙ	DΙ	E S	S	ΑU	(00	UF	3	D	U						82
	Н)	V A F D U																							0 N	83
	I)	MIS DE CUL	LA	C	ОΝ,	JU	GA:	IS (ΟN	D	ΑN	S	L	E	F	ΙL	TF	RA	Ţ	D	ES					84
	J)	ESS DIO	SAI CAR	S Y O	DE TI(CI IUÇ	IL ES	ΓU1	R E	<u>I</u>	N	۷:	1.1	R 0		DE •••			LA 	M	EΝ	T S	•			87
		a)	ax	én	iqι	ı e s	s	•	• •	• •	• •	•			•			• •		•						87
		ъ)			ero																		•	• •		88
CHAPITRE	VII	I -	V <u>I</u> T <u>I</u>	<u>0L</u> SS	T I ACI UL <i>I</i> ILI	EA A I I	SI RES	JR S	L ET	V D	CR	()	ΙS	SA	M	C F.	Ī	ĴΕ	S	С	0 L	10	! I !	E S		
	Α)	A C T d e	ΓΙΟ <u>SΙ</u>	N LE	DU NE	C1 A1	HAI LB/	1P:	I G	N O	N 	S١	JR	L 	E :	s 	T :	I S • •	S U	\ •	Ι	s ()Ll	E S		90
	В)	L':	I N H M I	IB LI	IT: EU	I 0 I	N E	ES'	T - L T	E L U R	LE E?		DU •••	Ε	Α.	U 	N	Α	P P	• A	UV	R 1	S :	S E	MENT	94

	C)	MODIFICATION DU PH DU MILIEU DE CULTURE ?	Ų
	D)	REJET PAR LE CHAMPIGNON DE SUBSTANCES INHIBITRICES DANS LE MILIEU DE CULTURE :	
		a) Effet du milieu de culture du champignon sur la croissance des colonies tissulaires de Silene alba	6
		sur la croissance d'une suspension cellulaire de <u>Silene alba</u>	7
CHAPITRE	VI	II - IDENTIFICATION D'ENZYMES, D'ACIDES AMINES LIBRES ET PROTEIQUES DANS LE MILIEU DE CULTURE D'USTILAGO VIOLACEA	
	A)	EVOLUTION DES PROTEINES EXCRETEES AU COURS DE LA CROISSANCE	9
	B)	ACIDES AMINES LIBRES	Ī
	C)	ACIDES AMINES PROTEIOUES 101	Į
	D)	DETERMINATION DES ENZYMES LIBEREES DANS LE MILIEU	I
CHAPITRE	ΙX	- INFECTION EXPERIMENTALE DE SILEME ALBA ET S.DIOICA PAR USTILAGO VIOLACEA	
	A)	ACTION D'UNE SOUCHE LEVUROIDE HAPLOIDE d'USTILAGO VIOLACEA SUR LES FRAGMENTS DE TIGE DE SILENE ALBA	1
	B)	ACTION D'UNE SOUCHE LEVUROIDE HAPLOIDE d'USTILAGO VIOLACEA SUR LES PLANTULES DE SILENE ALBA	5
	C)	INFECTION DE NOEUDS PROVENANT DE TIGES SAINES PAR LE MYCELIUM DICARYOTIQUE	,
	D)	INFECTION DES SILENES PAR LES TELIOSPORES OU LES SPORIDIES CONJUGUEES <u>D'USTILAGO VIOLACEA</u> :	
		a) Infection des plantules de <u>Silene alba</u> cultivées en serre	
		b) Les rosettes cultivées en serre 106 c) Les fragments de tiges de <u>Silene alba</u> cultivés in vitro	

	E)	INFECTION DES SILENES PAR LES SPORIDIES CONJUGUEES :	
		a) Silènes cultivés en serre : I) Les plantules	107 108
		b) Silènes cultivés en champ	108
		c) Silènes cultivés <u>in vitro</u> I) Les plantules de <u>Silene alba</u> 2) Fragments de tiges	111 110 100
CHAPITRE	X	- ETUDES CYTOLOGIQUES DES MODIFICATIONS STRUCTURALES PROVOQUEES PAR <u>USTILAGO</u> <u>VIOLACEA</u> CHEZ <u>SILENE DIOICA</u>	
	A)	LOCALISATION D'USTILAGO VIOLACEA DANS LES TISSUS VEGETATIFS DE <u>SILENE DIOICA</u> :	
		a) Cellules des apex non-parasités	114
		b) Cellules de méristèmes parasités	115
		c) Faisceaux criblo-vasculaires et méristèmes axillaires	115
	В)	MODIFICATION DE LA MORPHOGENESE DES FLEURS MALES ET FEMELLES DE <u>SILENE DIOICA</u> SAINES ET PARASITEES PAR <u>USTILAGO VIOLACEA</u> :	
		a) Développement de l'androcée et formation du pollen dans la fleur mâle saine	118
•		b) Développement et morphologie de la fleur mâle parasitée	IZI
		c) Apparition du mycélium dans les tissus de l'anthère	122
		d) Nécrose ponctuelle au sein du massif sporogène	123
•		e) Extension du phénomène nécrotique à l'ensemble du massif sporogène	124
		f) Invasion de la cavité sporangiale par les hyphes mycéliens	125

Ω	
⊃	

	g) Sp	orul	atio	n									•				125
			béra															126
		Co	nc lu	sion	:													
		I)	Le :	mvcé	lium													I 28
			Mod														•	
				sus														130
		3)	Mod hôt	ific es .													•	131
C)			PPEM ET P				HOL	OG I	E D	E L	A F	LEU	JR	FEI	MEL	LE		
	a)	Bou	tons	flo	raux	sa	ins					• • •				• •	:	I 35
	ъ)	Les	ovu	les	sain	s.						• • •					•	136
	c)	Bou	tons	flo	raux	рa	ras	ité	s.		• • •		• •					I 3 7
	d)	0vu	les :	para	sité	s.							• •				•	137
	e)	Spo	rula	tion	du	par	asi [.]	te	• • •		• • •	• • •	• •	• •	• • •	• •	;	I 39
CHAPITRE	ΧI	-	TROPRE:	UBLES SENC HERES	E D'	UST	ILA	G 0	VIOI	AC	ΕÀ	DAN	IS	LES	3	<u>A</u>		
A)	DOI	NNEE	S CY PAR	TOCH ASIT	IMIQ EES	UES PAR	SU!	R L TIL	ES /	TN P V I V	HER DLA	ES CE <i>F</i>	DE	<u>s:</u>	ILE	NE		
	a)	Pol	ysac	char	ides	:												
			Anth											• • •			•	[44
			Anth															
			2-I ·	- Pa:	rois	sq	uel(ett	ique	e s				• • •			j	I 4 4
			2-2	- Am:	idon	еt	g1:	усо	gène	2 .	• • •			• • •]	145
	ъ)	Les	lip	ides	:													
	•		Anth			nes				• • •				• • •			7	146
			Anth															
			2-I ·		•				ales	s .			• •			• •		146
			2-2	- Ce	11u1	es :	spoi	rog	ènes	s .				• • •]	146
			2-3	- Ce	11u1	es 1	myc	éli	enne	e s	· · ·			• • •				147
	c)	Les	pro	téin	es .				• • • •					• • •				I 48

	В)	DONNEES CYTOCHIMIQUES SUR LES OVAIRES DE SILENE DIOICA PARASITE PAR USTILAGO VIOLACEA	
		a) Ovules sains	151 152
	C)	ANALYSES COMPARATIVES DES ACIDES AMINES LIBRES D'ORGANES VEGETATIFS ET FLORAUX DE <u>SILENE DIOICA</u> SAINS ET PARASITES · · · · · · · ·	I 5 3
CHAPITRE	ΧI	I - CONSIDERATIONS GENERALES	156

CHAPITRE I

HISTORIQUE

A - INTRODUCTION.

Les ustilaginales (Hemibasidiomycètes) sont des champignons parasites, responsables d'une maladie appelée "charbon" ou "carie"; ils sont les hôtes habituels des caryophyllacées et se manifestent soit:

- sous forme de lésions foliaires ; <u>Ustilago longissima</u> (SCH.) M.
- par un envahissement plus ou moins généralisé des organes floraux ; <u>Ustilago tritici</u> (PERS) R.; Tilletiacees, Cintractia etc...
- par la destruction des anthères seules ; <u>Ustilago violacea</u> (PERS) R.
- par l'attaque de l'ovaire seul ; <u>Tilletia</u>, <u>Thecaphora</u>
- par la formation de tumeurs ou galles ; <u>Ustilago maydis</u> (DC) Cda.

A l'exception de <u>Ustilago vriesiana</u> (YIULL) sur <u>Eucalyptus</u> et <u>Ustilago Treubii</u>(SOLMS) sur <u>Polygonum chinensis</u>, ils attaquent rarement les éléments ligneux (VIENNOT - BOURGIN, 1949).

Indépendamment des troubles importants qu'ils peuvent provoquer dans le développement de la plante hôte (nanisme, gigantisme, mycocecidies, castration parasitaire, etc...), il semble qu'ils soient aussi la cause de maladies graves du bétail et de l'homme. Des troubles physiologiques semblables à l'acrodynie infantile ont été observés sur des enfants alimentés de bouillie de maïs parasitée par <u>Ustilago maydis</u> (DEBRE et NEVOT, 1939); GREIG (1924) a obtenu l'avortement d'une chèvre par absorption, pendant cinq jours, d'une cuillèrée de spores de charbon de blé <u>Ustilago tritici</u> (PERS) R; de plus, il observa des convulsions épileptiques sur un chien ayant absorbé des spores de carie. Enfin, des troubles graves ont été attribués à des fourrages d'avoine parasités par <u>Ustilago avenacei</u> (W) cif. ou à du brome attaqué par <u>Ustilago</u> bromivora (Tul). F. (VIENNOT - BOURGIN, 1949).

Malgré cette toxicité évidente des spores à l'égard de l'homme et des animaux, certains faits prouvent que, dans certains cas, ces spores peuvent jouer un rôle médical ou alimentaire, leur ingestion, même en grande quantité, n'étant pas nuisible.

B - BIOLOGIE DU CHAMPIGNON.

a) cycle de développement :

Depuis les travaux de GIARD (1888) sur la castration parasitaire de Lychnis dioica (L) par Ustilago antherarum Fr. (Ustilago violacea Pers. R), de nombreux auteurs (WANG 1934, BAKER 1947, EVANS et WILSON 1971, etc...) ont décrit les modifications morphologiques provoquées par ce parasite, considéré comme obligatoire sur plus de 100 espèces de Caryophyllacées en EUROPE, en ASIE, en AFRIQUE et en AMERIQUE (VIENNOT - BOURGIN, 1949).

Le cycle de développement d'Ustilago violacea comporte, selon CRADEFAUD et Coll. (1963), deux phases successives : l'une et l'autre sporophytiques, séparées par une perittogamie (fig. I). La phase primaire est engendrée par les sporidies provenant du promycélium que la téliospore émet à la germination. Ces téliospores se forment en quantité considérable dans les anthères de silènes parasitées. Elles sont de couleur brun violacé, leur paroi est réticulée, leur forme arrondie, leur taille varie de 4 à 14 µm de diamètre.

Les sporidies sont des cellules haploïdes, lévuriformes, qui se multiplient par bourgeonnement; lorsqu'elles s'unissent deux à deux pour former des cellules à dicaryon, c'est la périttogamie (PL.I - Fig.I).

Au cours de la phase secondaire, le mycélium dicaryotique engendré par les cellules à dicaryons se développe en parasite dans les tissus de la plante-hôte et produit des spores charbonneuses appelées selon les auteurs, "téliospores", "téleutospores" ou "chlamydospores". Lorsque les spores sont libérées, elles germent et produisent un organe sporidien (probaside ou promycélium), producteur de sporidies, et le cycle recommence.

b) germination des téliospores :

Chez les Ustilaginées, les téliospores comme les téleutospores des Urédinées se maintiennent pendant la période de vie latente sous forme binucléée (HEIM, 1971) et non uninucléée comme il a été admis par WANG (1932) et CHADEFAUD et coll. (1963).

Il n'a pas été établi d'une façon certaine, à quel endroit (téliospore ou promycélium) s'effectue la première division du noyau, ni à quel moment s'accomplit la réduction

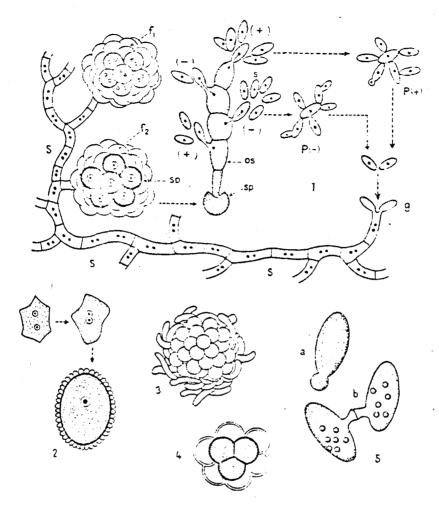
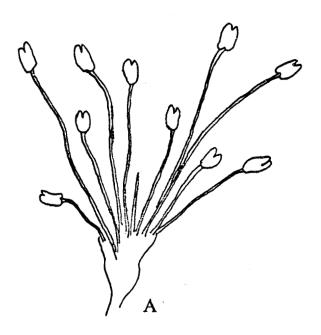


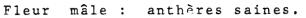
Fig. I : Cycle des Ustilaginales (selon Chadefaud et coll., 1963).

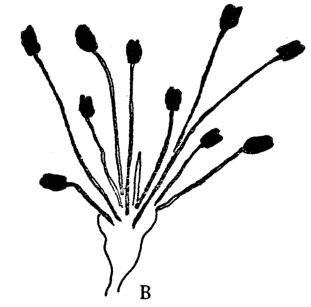
1. Le cycle des Ustilaginales : P (+) et P (-), phase primaire (= colonies de cellules levuriformes haploïdes, les unes positives, les autres négatives); g, copulation (= perittogamie) de deux cellules de la phase primaire, l'une (+), l'autre (-); S, phase secondaire (=mycélium dicaryotique, parasite); f_1 , fruit charbonneux avec jeunes spores charbonneuses, encore à dicaryon ; f_2 , fruit charbonneux plus agé; spores charbonneuses (sp) devenues diploïdes, par une caryogamie ; os, archéobaside convertie en un organe sporidien, producteur de sporidies (s), les unes (+), les autres (-), d'où dériveront de nouvelles colonies de cellules levuriformes. Souvent, au lieu de produire ces colonies, les sporidies se conjuguent elles-mêmes entre elles, chaque sporidie (+) avec une sporidie (-); - 2. Chez l'Ustilago du Salsifis (= U. tragopogonis), transformation d'une cellule à dicaryon en une spore charbonneuse diploïde ; - 3. Chez le Sorosporium de la Saponaire (= S. saponariae), jeune fruit charbonneux, formé par une masse compacte de spores charbonneuses, dans un péridium composé d'hyphes (qui ensuite se gélifient); - 4. Chez l'Urocystis du Seigle (= U. occulta), petit fruit charbonneux formé de quelques spores charbonneuses agglomérées, entourées d'un péridium composé de cellules stériles, hyalines ; - 5. Phase primaire de l'Ustilago violacea, des fleurs du Lychnis dioîque : a, cellule levuriforme bourgeonnant une cellule-fille (pas de lipides); b, copulation de deux cellules levuriformes (riches en globules lipidiques).



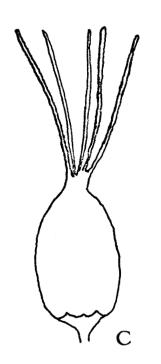
Fig 2 Silene dioica (Pers.) R.



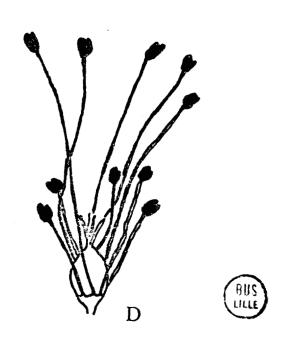




Fleur mâle : anthères parasitées



Fleur femelle saine



Fleur femelle parasitée : apparition de deux verticilles d'anthères parasitées. Ovaire atrophié.

chromatique. Diverses hypothèses ont été avancées ; selon WANG (1932), la première division du noyau (2 n) est réductionnelle, elle a lieu au moment de la production du promycélium. L'un des deux noyaux fils passe dans ce promycélium où s'effectue la deuxième division. Les travaux de HEIM (1971) révèlent, qu'au moment de la germination de la spore, l'enveloppe sporale se déchire et dégénère sur place. Le contenu cellulaire, cytoplasme et noyau, s'étale en un promycélium, et c'est dans cette masse, autour de laquelle quelques résidus de membranes en dégénérescence sont encore visibles, qu'ont lieu les divisions nucléaires.

Si les auteurs ne sont pas d'accord sur l'état caryologique de la téliospore, ni sur les différents moments et lieux des divisions nucléaires au cours de la germination, ils sont unanimes pour admettre que, théoriquement, la spore germe en un tube (le promycélium) qui se partage en trois ou quatre cellules, émettant chacune une ou plusieurs sporidies hyalines uninucléées.

HASSAN et MACDONALD ont montré en 1971, que les téliospores d'<u>Ustilago violacea</u> peuvent germer dans des anthères encore fermées : lorsqu'on les met en suspension dans l'eau distillée à 18°C, la germination commence après 4 heures 15 minutes. Les promycéliums qui en résultent comprennent deux à trois cellules, rarement quatre ; ces dernières émettent des sporidies qui se multiplient végétativement toutes les 45 minutes (POON et DAY, 1974).

Le pourcentage de germination des téliospores n'est pas affecté par la teneur du milieu en glucose ou en maltose (entre 0 et 5 %), ni par la lumière. Par contre, il varie en fonction du pH (optimum 6,6) et en fonction de l'âge des téliospores (40 à 50 % de germination après deux ans de conservation) (HASSAN et MACDONALD, I97I). Selon ces auteurs, la meilleure germination s'obtient dans l'eau stérile, alors que pour <u>Ustilago striiformis</u>, certaines substances telles que le benomyl, favorisent la germination et la croissance (ROBINSON et HODGES, I973).

c) formation des dicaryons :

Les sporidies haploïdes émises par les cellules promycéliennes sont de signe (+) et (-); elles se conjuguent entre elles pour devenir des dicaryons (VIENNOT - BOURGIN, 1964). Cette conjugaison peut aussi se produire entre les sporidies secondaires issues de la multiplication végétative des primaires. On peut aussi observer des conjugaisons entre une sporidie et une cellule promycélienne, entre deux articles d'un même promycélium, ou entre deux promycéliums différents (POON, MARTIN et DAY, 1974). La conjugaison peut débuter après 2 heures 30 minutes, mais à 20 ou 22°C, 40 % seulement des cellules fusionnent après 6 heures de contact. Une étude approfondie du phénomène montre qu'il se réalise en cinq phases:

- appariement des cellules de types opposés,
- développement d'ampoules copulatrices sur chacune des cellules en leur point de contact,
- élongation de ces ampoules copulatrices,
- dissolution des parois et membranes plasmiques au point de contact et formation d'un tube,
- élongation du tube de conjugaison.

d) Mycélium dicaryotique :

Si <u>Ustilago violacea</u> peut être cultivé en milieu synthétique sous sa forme asexuée, le mycélium dicaryotique qui provient de la conjugaison des sporidies (+) et (-) (PL.I - Fig. 8 et 9), ne peut pas se développer en dehors de la plante-hôte; c'est donc un parasite strict (BAKER, 1948; CLEMENT et coll., 1969; HASSAN et MACDONALD. 1971).

Dans l'eau gélosée, I. IO⁻⁵ sporidie conjuguée peut émettre, 48 heures après la fusion, un court hyphe mycélien qui dégénère en produisant des sporidies quatre jours plus tard (DAY et JONES, 1968).

L'examen microscopique de différents organes d'une plante parasitée révèle que le mycélium dicaryotique est présent dans les anthères, abondant dans les espaces intercellulaires à la base de l'ovaire et entre les cellules parenchymateuses adjacentes aux tissus conducteurs ; dans les tiges, le développement du mycélium est plus important au niveau des noeuds que dans les entrenoeuds (HASSAN et MACDONALD, 1971) ; il serait également présent dans les racines, où BAKER (1947) pense qu'il peut subsister pendant plusieurs années et être à l'origine de nouvelles fleurs parasitées tous les ans.

C - BIOLOGIE DE SILENE ALBA (Miller) E.H.L. Krause et SILENE DIOICA (L.) CL

Silene alba et S.dioica sont deux espèces dioïques appartenant à la famille des Caryophyllacées. Ce sont les hôtes habituels d'<u>Ustilago violacea</u>; LINNE les avait décrites comme espèce commune <u>Lychnis dioica</u> (L.) avec les deux sous-espèces, celle à fleurs rouges et celle à fleurs blanches (Flore de France : BONNIER, 1948).

Ces espèces ont été séparées du genre <u>Lychnis</u> parce que le nombre de dents des capsules est double de celui des styles (Flore de Belgique, du G.D. du Luxembourg, etc..., 1973).

Contrairement à la plupart des Silènes dont les capsules présentent des cloisons plus ou moins importantes à la base, les deux espèces qui nous intéressent n'en présentent pas ; ceci a permis à certains auteurs, de les ranger dans le genre Melandrium (Flora Europaea, 1964). Selon cette flore, Silene alba (Miller) E.H.L. Krause ou Melandrium album (Miller) Garcke, est une plante dioïque, vivace et parfois annuelle ; elle peut avoir 80 cm de hauteur avec de nombreuses ramifications.

Les tiges sont garnies de poils mous et glanduleux. Les feuilles sont ovales et pointues aux extrémités, les feuilles caulinaires étant sessiles. L'inflorescence est une cyme lâche avec de grandes fleurs légèrement parfumées, s'ouvrant le soir. Le calice-des fleurs mâles mesure I5 à 22 mm et porte I0 nervures, celui des fleurs femelles plus ou moins gonflé, mesure 20 à 30 mm et porte 20 nervures. Les pétales sont généralement blancs, les styles sont au nombre de cinq et la capsule (I0 à I5 mm), de forme ovale, s'ouvre par dix dents. C'est une plante que l'on trouve dans toute l'Europe, de préférence dans les champs cultivés.

Silene dioica (L.) Clairv. ou Melandrium dioicum (L.)

Cosson et Germ. ou Melandrium rubrum (Weigel) Garcke, ou Melandrium sylvestre (Schkuhr) Röhl.

Cette plante est semblable à <u>Silene alba</u>, mais elle est surtout vivace. Les tiges sont peu glanduleuses, les feuilles largement ovales, les fleurs rouges s'ouvrent le jour. Le calice mesure IO à I5 mm, les dents sont largement triangulaires et la capsule (IO à I5 mm) globuleuse et ovoïde, s'ouvre par des dents recourbées. Elle vit dans les sous-bois et on la retrouve dans la plupart des pays européens.

D - MODE D'INFECTION PAR LES USTILAGO.

VIENNOT-BOURGIN (1964) pensait que la dissémination du champignon pouvait se faire par le vent, la pluie et les insectes. D'autres recherches ont été entreprises pour tenter de déterminer comment le parasite s'introduit dans la plante-hôte.

a) Infection par les graines :

Dès 1883, BREFELD suggérait que les graines pouvaient être l'un des moyens de transmission d'<u>Ustilago violacea</u>.

Cette hypothèse a été discutée par BAKER (I948) et GIULIANO (I964); toutefois, les expériences de HASSAN et MACDONALD (I971) montrent que ce moyen de contamination est peu probable dans la nature. Cependant, WANDERWALLE (I935) en injectant artificiellement du mycélium charbonneux d'<u>Ustilago nuda</u> dans les embryons de graines d'orge a obtenu des plantes parasitées ; de même, VEENENBOS et BRANDSMA (I957) en éprouvant l'activité de divers fongicides ont observé I4 % d'infection après avoir enrobé de spores, des semences humides.

b) Infection par les plantules :

Certains chercheurs ont montré que l'épiderme fragile des plantules pouvait être une voie de pénétration du parasite. Par exemple, WANDERWALLE et SOMMEREYNS (1965) en trempant des coléoptiles d'orge sectionnés dans une suspension aqueuse de spores d'Ustilago nuda obtiennent 50 % de plantes charbonnées. De même, DAY et JONES (1968) en injectant à la seringue, une suspension concentrée de sporidies diploïdes d'Ustilago violacea, à l'aisselle de jeunes feuilles de plantules de Silene alba, obtiennent 80 % à 100 % de plantes parasitées. Enfin, HASSAN et MACDONALD (1971) ont réalisé des infections sur des plantules de Silene dioica (25 mm) en les trempant dans une suspension de téliospores d'Ustilago violacea ; après 6 heures de contact avec les spores, chaque plantule est transplantée dans un petit pot contenant du sol indemne de contamination : IO mois plus tard, toutes fleurissent et 30 plantules sur 35 sont infectées.

c) Infection par les fleurs :

NIELSEN (1968) a obtenu des épis charbonneux d'orge après inoculation, à la seringue, dans les fleurs, de mycélium dicaryotique d'<u>Ustilago nuda</u> isolé sur milieu synthétique.

HASSAN et MACDONALD (1971), après avoir inoculé une suspension de chlamydospores d'<u>Ustilago violacea</u> dans les fleurs de <u>Silene alba</u>, maintiennent les plantes en fleurs toute l'année, en les plaçant en serre à I8°C, et en les éclairant I8 heures par jour. Dans ces conditions, six pieds mâles sur huit et un pied femelle sur huit présentent dix mois plus tard, les symptômes caractéristiques de l'infection.

d) Infection par les bourgeons :

RADULESCU et MUNTEANU (1967) montrent que l'injection d'une suspension de spores d'<u>Ustilago maydis</u> dans de jeunes bourgeons du maïs permet d'infecter les plantes à n'importe quelle étape de leur développement. D'ailleurs, les travaux de BECERESCU (1973) sur de nombreuses espèces d'<u>Ustilago</u> (<u>Ustilago nuda, U.tritici, U.nigra, U.hordei</u>) montrent que la pénétration des parasites peut se faire par les bourgeons, les plantules ou les fleurs, mais qu'il n'est pas possible, par les méthodes classiques, de préciser si la pénétration des champignons se fait préférentiellement par un organe ou un autre.

En ce qui concerne <u>Ustilago violacea</u>, certains auteurs pensent que l'infection aurait lieu par la région apicale de la plante-hôte, puis le mycélium passerait directement dans les organes floraux : le cyclede développement du champignon s'effectuant entre le pédoncule floral et les anthères (GIULIANO, I964). Cette hypothèse, déjà formulée par VUILLEMIN en 1891, est reprise par HASSAN et MACDONALD (1971);

en effet, en injectant une suspension concentrée de spores dans des bourgeons de <u>Silene alba</u> cultivé en serre, ces auteurs ont constaté que huit mois plus tard, six pieds mâles sur huit et un pied femelle sur huit présentaient les symptômes caractéristiques des plantes parasitées.

Des tentatives d'infection artificielle par les feuilles ou les tiges n'ont donné aucun résultat positif, le mycélium dicaryotique semblant incapable de pénétrer dans les tissus adultes de <u>Silene alba</u> (BLARINGHEM, 1923).

Ainsi, les organes les plus favorables à la pénétration du parasite sont les bourgeons, les fleurs, les plantules et, éventuellement, les graines, dont il est possible d'infecter artificiellement une plante par injection de chlamydospores; les graines étant des appareils incorporant les organismes plantules dont les organes sont les bourgeons, tiges, feuilles et fleurs (FAVRE-DUCHARTRE, 1970).

MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES PROVOQUEES PAR LE CHAMPIGNON.

Il est très rare qu'après une infection parasitaire, la plante se développe normalement ; le plus souvent, on assiste à des troubles du métabolisme qui peuvent se traduire par des modifications morphologiques. <u>Ustilago kolleri</u> (W.) qui parasite <u>Avena sativa</u> (L.) détruit la partie interne de la base des épillets (ZAMBETTAKIS. 1970); <u>Ustilago hordei</u> (Pers.) K.S. responsable du charbon de l'orge, hypertrophie les épillets avant que les épis parasités ne se distinguent par leur teinte noirâtre (WANG. 1934).

l'action d'<u>Ustilago violacea</u> sur <u>Silone alba</u> et <u>S.dioica</u> varie selon qu'il s'attaque aux pieds mâles ou femelles. Sur les pieds mâles, le champignon apparaît dans les anthères qui prennent l'aspect charbonneux bien avant l'éclosion des boutons floraux (BAKER, 1948; MANI, 1964): les anthères se transforment en vésicules de teinte violacée, remplies de spores qui occupent la place des grains de pollen. Dans certains cas, les plantes parasitées sont aussi atteintes de nanisme (BAKER, 1948; EVANS et coll., 1971), mais les symptômes de l'infection ne sont vraiment caractéristiques qu'au moment où les anthères éclatent et libèrent les spores (Fig.2 - A et B).

Les pieds femelles parasités sont stériles : les ovaires se développent anormalement ; leur taille est réduite ; ils sont de forme allongée et portés par un pédoncule qui reste grêle. En même temps, les fleurs femelles différencient des étamines, ce qui leur donne l'aspect de fleurs hermaphrodites (BAKER, 1947). Ces étamines sont remplies de spores charbonneuses, et il semblerait qu'elles soient les seuls organes dans lesquels le champignon soit capable de développer ses organes reproducteurs (Fig.2 - C et D).

F - FACTEURS HORMONAUX.

Différents auteurs ont étudié l'action de certaines hormones sur le développement de <u>Silene alba</u>. D'autres ont analysé les facteurs de croissance secrétés par <u>Ustilago violacea</u>.

a) Action des hormones sexuelles animales.

LOVE et LOVE (1945) ont étudié l'action de l'oestrogène et de la testostérone sur le développement des plantes dioïques, en particulier Silene alba. S'ils appliquent

sur les bourgeons, de la lanoline contenant de faibles doses (0,0005 à 0,1 %) de ces hormones, 60 % des plantes meurent; parmi les plantes qui survivent, celles qui présentent des déformations varient selon la concentration et la nature de l'hormone. L'oestrogène, hormone femelle, n'affecte pas les pieds femelles du <u>Silene alba</u>, quelle que soit sa concentration; par contre, la testostérone à la dose de 0,01 % les rend hermaphrodites.

De même, les pieds mâles traités à l'oestrogène produisent un ovaire, alors que la testostérone ne les affecte pas.

Malgré les anomalies, il n'y a pas formation de grains de pollen dans les anthères, et les ovaires restent stériles ; cela permet cependant de constater qu'un traitement hormonal peut modifier le sexe des plantes dioïques dans le sens attendu par le sexe que chacune représente, ce qui laisse supposer une parenté des mondes animal et végétal.

b) <u>Production d'A.I.A.</u> (acide indolyl acétique), <u>d'I.A.N.</u> (indol-acéto nitrile) et d'<u>A.G.</u> (acide gibbéréllique).

L'analyse d'extrait alcoolique de <u>Silene alba</u> a permis de mettre en évidence la présence d'A.I.A. et d'A.G. dans les plantes saines ou infectées; mais il y a plus d'A.G. dans les plantes saines, ce qui expliquerait peut-être le nanisme observé par EVANS et WILSON (I97I) chez les plantes parasitées; les auteurs n'ont retrouvé ni A.G., ni A.I.A. dans le milieu de culture des téliospores d'<u>Ustilago violacea</u>, mais ils constatent la présence d'I.A.N. Toutefois, l'application exogène de ce nitrile à une plante saine ne provoque chez elle aucun trouble.

Les travaux de HIRATA (1957) et de NOVAT (1967) ont montré qu'<u>Ustilago violacea</u> synthétise de l'A.I.A., mais rien ne prouve que cette substance soit responsable des

modifications observées sur les plantes parasitées. De même, les extraits aqueux de stigmates de <u>Silene alba</u> possèdent une activité auxine-oxydasique; chez les plantes saines, les sépales des fleurs mâles contiennent beaucoup plus d'anthocyane que les sépales des fleurs femelles mais, après infection, le taux de ce pigment est presque semblable dans les fleurs des deux sexes (GARY et SAGI, 1960).

•

Malgré les précieuses indications fournies par ces auteurs sur la biologie de <u>Silene alba</u> et <u>S.dioica</u> et sur celle d'Ustilago violacea, les relations hôte -parasites restent encore bien imprécises ; on ignore toujours à quel endroit et dans quel tissu se situe le mycélium parasité avant la différenciation des organes floraux ; pourquoi, malgré la présence évidente du parasite, il est difficile de distinguer, avant la floraison, les plantes parasitées des plantes saines, le développement végétatif des premières étant à peine troublé; pourquoi Ustilago violacea ne développe ses organes reproducteurs que dans les anthères, et par quel processus ses téliospores prennent la place des grains de pollen; pourquoi la présence du champignon provoque la différenciation des anthères dans les fleurs femelles et, au niveau des anthères, quels sont les éléments déterminants pour la sporulation du parasite.

Certes, des études génétiques (WARMKE, I946; WESTEGARD, I953) avaient démontré l'existence d'un chromosome sexuel Y, déterminant absolu du sexe mâle; néanmoins, lorsque les anthères apparaissent dans les fleurs femelles sous l'action d'<u>Ustilago violacea</u>, il n'y a pas, au niveau génétique, apparition de ce chromosome Y.

Par ailleurs, des modifications morphologiques peuvent apparaître spontanément, à un taux très faible sur des plantes saines, ce qui fait dire à HASSAN et MAC DONALD (1971), qu'il s'agirait peut-être d'un caractère chromosomique apparu à la suite d'une infection, caractère récessif qui ne s'exprimerait qu'après plusieurs générations.

Il s'agit donc d'un problème complexe dont l'étude est rendue difficile par la courte période de végétation des Silènes. Nous avons pensé que les techniques de culture in vitro, les techniques biochimiques, cytologiques et cytochimiques, la microscopie optique (M.O.) et la microscopie électronique à transmission (M.E.T.) nous permettraient de répondre à ces nombreuses questions, et pourraient être une contribution à l'étude des phénomènes de castration parasitaire.

CHAPITRE II

MATERIEL ET TECHNIQUES

A - CHOIX DES MILIEUX DE CULTURE.

Nous avons recherché les milieux de culture qui pourraient assurer à la fois la croissance du parasite et celle de son hôte.

HASSAN et MAC DONALD (1971) ont montré que les téliospores d'Ustilago violacea germent mieux dans l'eau distillée que dans une solution glucosée à 5 % ou dans l'extrait de malt ; toutefois, pour réaliser nos expériences, il était intéressant de disposer d'un inoculum capable d'infecter des tissus végétaux sains. L'eau distillée, par suite de phénomènes de carence, ne permet pas la culture indéfinie du champignon, et est incapable d'assurer la croissance des tissus de l'hôte.Il a donc fallu rechercher un milieu plus riche, susceptible d'entretenir l'Ustilago sans provoquer de mutation, ni altérer son pouvoir pathogène à l'égard des silènes. Nous avons donc comparé l'effet de milieux utilisés habituellement, soit pour la culture de cellules ou de tissus végétaux (HELLER, 1953; MURASHIGE et SKOOG, I962; LESCURE, I966), soit pour la culture des champignons (SABOURAUD, 1908; CZAPECK, 1921).

B - METHODE D'ETUDE DE LA GERMINATION DES TELIOSPORES RECOLTEES DANS LA NATURE.

Les téliospores proviennent d'anthères de fleurs parasitées de <u>Silene dioica</u> récoltées dans un bois aux environs de Lille, et conservées pendant six mois dans des boîtes de Pétri, à la température du laboratoire (20-22°C).

Tous les milieux de culture sont liquides ; ils contiennent 3 % de sucre et les éléments nutritifs de la solution de MURASHIGE et SKOOG, de SABOURAUD ou de LESCURE : une culture sur eau distillée servant de témoin. Environ I ml de milieu est mis dans une micro-cuvette de 5 ml, placée dans une boîte de Pétri.

Les téliospores d'un même bouton floral sont réparties à l'aide d'une pince fine dans trois micro-cuvettes. Les cultures sont maintenues dans une pièce à $2I^{\circ} + I^{\circ}C$.

Le taux de germination est évalué au microscope optique. Après homogénéisation, une goutte de culture prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur est mélangée à une goutte de bleu lactique pour être observée entre lame et lamelle. Pour chaque milieu, une moyenne de 5.000 téliospores est observée dans une dizaine de préparations.

C - METHODE DE DESINFECTION DES TELIOSPORES RECOLTEES DANS LA NATURE.

Nous avons essayé d'obtenir des téliospores aseptiques, soit en désinfectant les boutons floraux, soit en désinfectant directement les téliospores.

a) Traitement des boutons floraux :

Les jeunes boutons floraux, encore parfaitement fermés et provenant de plantes parasitées, contiennent déjà les téliospores du champignon. Nous espérons pouvoir les obtenir dans des conditions aseptiques, après avoir désinfecté extérieurement des boutons en les trempant successivement dans une solution de mercryl à 3 % pendant I5 minutes, puis dans une solution d'hypochlorite de calcium à I20 g/l pendant 20 minutes. Ils sont ensuite rincés trois fois à l'eau stérile (5, I0, I5 minutes) et nous avons prélevé les téliospores qui sont mises à germer dans une goutte d'eau distillée autoclavée. Le contenu d'un même bouton est réparti sur dix lames différentes. 24 heures plus tard, l'observation microscopique permet de constater que les spores germent, mais que des bactéries subsistent dans la suspension.

b) Désinfection des téliospores :

Nous avons alors pensé pouvoir obtenir des téliospores aseptiques en les traitant par un antibiotique, dans la mesure où cette substance élimine les bactéries sans empêcher la germination des spores. Nous avons donc comparé l'action de différents antibiotiques, afin de déterminer celui qui se révélerait le plus efficace.

Des solutions d'antibiotique à différentes concentrations sont réparties dans des micro-cuvettes. Les préparations sont observées au M.O. et les résultats sont exprimés en pourcentage de téliospores germées en présence ou en absence de bactéries.

MILIEU DE LESCURE (1966)

! COMPOSITION D	U MILIEU :	CONCENTRAT	ION (g.1 ⁻¹)!
! ! Nitrate de calcium	Ca (NO ₃) ₂ , 4 H ₂ O :	290.	10-3
! Chlorure de potassium	KC1	65.	10-3
! ! Nitrate de potassium	KN0 ₃	1960.	10 ⁻³
! Sulfate de magnésium	MgS0 ₄ , 7 H ₂ 0 :	360.	10-3
! Phosphate monopotassi	que KP0 ₄ H ₂	500.	10-3
! ! Phosphate disodique	Na ₂ P0 ₄ H, 12 H ₂ 0:	97.	10-3
!			!
! Acide borique	н ₃ во ₃ :	1,5.	10-3
! ! lodure de potassium	KI	0,75.	10-3
! ! Sulfate de manganèse	MnS0 ₄ , 4 H ₂ 0	4,5.	10-3
! ! Sulfate de zinc	ZnS0 ₄ , 7 H ₂ 0	1,5.	10-3
1	FeSO ₄ , 7 H ₂ O :	2,785.	10-3
! ! Sulfate de fer	Na ₂ EDTA :	3,725.	10 ⁻³ !
!	: :		!
! ! Thiamine	Vitamine B ₁ :	1.	10-3
!			!
! ! Acide 2,4 dichloro-pho	énoxyacétique :		_3 !
! (2,4 D)	:	1.	10 ⁻³ !
!	•		!

MILIEU DE SABOURAUD (1908)

Ţ		:	1	<u> </u>
!	Peptone	:	30 g.1 ⁻¹	!
!	•	:	1	i
!	Glucose	:	30 g.1 ⁻¹	!
!	•	:	-	!

MILIEU DE HELLER (1953)

! COMPOSITION DU MILIEU !	CONCENTRATION (g.1 ⁻¹⁾
! ! KC1	750. 10 ⁻³
! NaNO ₃	600. 10 ⁻³
! SO ₄ Mg, 7 H ₂ O	250. 10 ⁻³
! PO ₄ H ₂ Na, H ₂ O	125. 10 ⁻³
! CaCl ₂ , 2 H ₂ O	75. 10 ⁻³
! FeCl ₃ , 6 H ₂ O	1. 10 ⁻³
! SO ₄ Zn, 7 H ₂ O	1. 10 ⁻³
! H ₃ B0 ₃	1. 10 ⁻³
! SO ₄ Mn, 4 H ₂ O	0,1. 10 ⁻³
! SO ₄ Cu, 5 H ₂ O	0,03. 10 ⁻³
AlCl ₃	0,03. 10 ⁻³
! NiCl ₂ , 6 H ₂ O	0,03. 10 ⁻³
! KI	0,01. 10 ⁻³
!	!

MILIEU DE CZAPECK (1921)

! ! COMPOSITION DU MILIEU !	: CONCENTRATION (g.1 ⁻¹)
! ! NaNO ₃	2
K ₂ PG ₄ H	1
MgS0 ₄ , 7 H ₂ 0	0,5
! KC1	0,5
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	0,001
<u>i</u>	<u>:</u>

MILIEU DE MURASHIGE ET SKOOG (1962) MODIFIE

COMPOSITION DU MILIEU	: CONCENTRATION (g.1 ⁻¹)
ELEMENT	S MINERAUX
NH ₄ NO ₃	: : 1650. 10 ⁻³
K NO ₃	: 1900. 10 ⁻³
CaCl, 2 H ₂ 0	: 440. 10 ⁻³
Mg SO ₄ , 7 H ₂ O	: 370. 10 ⁻³
К Н ₂ РО ₄	: 170. 10 ⁻³
Na ₂ EDTA	: : 37. 10 ⁻³
Fe SO ₄ , 7 H ₂ 0	: 27. 10 ⁻³
H ₃ B0 ₃	: 6. 10 ⁻³
MnS0 ₄ , 4 H ₂ 0	: 22. 10 ⁻³
ZnS0 ₄ , 4 H ₂ 0	: : 8. 10 ⁻³
KI	: 0,83. 10 ⁻³
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O	: 0,25. 10 ⁻³
CaSO ₄ , 5 H ₂ O	: 0,025. 10 ⁻³
CaCl ₂ , 6 H ₂ 0	: 0,025. 10 ⁻³
	: :
ELEMENTS	ORGANIQUES
Inositol	: 0,1
Edamine (caséine traitée par la trypsine)	: : 1 :
Glycocolle	: 2. 10 ⁻³
2,4 D	: 0,1. 10 ⁻³
Kinétine	: 0,1. 10 ⁻³
Acide nicotinique	: 0,5. 10 ⁻³
Pyridoxine HCl	: 0,5. 10 ⁻³
Thiamine	: 0,5. 10 ⁻³



D - METHODE DE CULTURE ASEPTIQUE DES PLANTES ENTIÈRES DE SILENE ALBA.

La présence d'<u>Ustilago violacea</u> dans les anthères des caryophyllacées n'est décelable qu'à l'ouverture des fleurs. Pour faire une étude approfondie de ce parasite, il est donc important de préciser les conditions de floraison des hôtes (<u>Silene alba</u> et <u>S.dioica</u>); nous avons étudié ces conditions sur des plantes entières.

Les graines de <u>Silene alba</u> sont stérilisées par immersion pendant I5 minutes dans du mercryl à 3 %, puis 30 minutes dans l'hypochlorite de calcium I20 g/l. Après trois rinçages à l'eau stérile, elles sont ensemencées aseptiquement dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau gélosée (0,8 %) sans aucune substance nutritive. Ces boîtes sont conservées à la température du laboratoire (20-21°C). Les graines germent et,huit jours plus tard, les plantules de 2 cm environ sont transplantées dans des tubes en pyrex de I3 x 3 cm renfermant environ 35 ml de milieu gelosé de MURASHIGE et SKOOG.

Les cultures sont réparties en quatre lots et placées respectivement à I5, 2I, 25 et $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$, éclairées 24 heures sur 24 par des tubes luminescents (type lumière du jour de luxe, intensité lumineuse environ I2.000 lux).

E - METHODE DE CULTURE ASEPTIQUE DES FRAGMENTS DE TIGES DE SILENE DIOICA ET S.ALBA SAINS OU PARASITES.

a) Plantes saines:

Des fragments de tiges préalablement désinfectés (3 % de mercryl laurylé pendant I5 minutes, et I40 g/l d'hypochlorite de calcium pendant 30 minutes) sont prélevés

au niveau des noeuds ; après rinçage à l'eau stérile, ces explantats sont ensemencés en position normale sur deux milieux, l'un minéral (HELLER, I953), l'autre plus complexe, renfermant des éléments minéraux, des éléments organiques et des phytohormones (MURASHIGE et SKOOG, I962). Les milieux sont gélosés par 0,8 % d'agar, auquel on ajoute 6 % de glucose. Les cultures sont réalisées dans des tubes en pyrex de 3 cm sur 16 cm, contenant environ 35 ml de milieu. Trois expériences de 20 paniers ont été réalisées. Les cultures sont entreposées dans une pièce à 2I ± I°C, éclairée 24 heures par jour par des tubes luminescents de type lumière de jour de luxe, dont l'intensité lumineuse totale est d'environ I2.000 lux.

b) Plantes parasitées :

Nous avons aussi cultivé des fragments de tiges prélevés sur des plantes parasitées pour recueillir des téliospores aseptiques à partir de fleurs charbonnées obtenues in vitro. Ces plantes parasitées sont récoltées dans un bois aux environs de Lille.

La technique et la méthode de culture sont les mêmes que précédemment.

F - CULTURE DE TELIOSPORES OBTENUES IN VITRO, ET ISOLEMENT DE CLONES COMPATIBLES (+) ET (-).

En plaçant dans de l'eau stérile des téliospores recueillies dans des fleurs (ou des boutons floraux) obtenus in vitro, elles germent rapidement (I2 h); leur taux de germination est bon (80 %). Nous avons pu ainsi observer les différentes phases de la germination.

Si l'on introduit 0,I ml de cette suspension dans 200 ml de solution nutritive de LESCURE, contenus dans des fioles de 500 ml placées sur un agitateur rotatif, quatre jours plus tard, nous obtenons une culture de couleur blanchâtre dont l'examen microscopique révèle l'abondance des sporidies et des promycéliums. Si on prélève une petite quantité de cette suspension et qu'on l'observe en goutte pendante, après I2 heures, on peut voir une quantité élevée de sporidies conjuguées. Il nous a donc paru intéressant d'entretenir cette première culture en la repiquant tous les dix jours dans le milieu initial (LESCURE) qui s'était révélé convenable pour la germination des téliospores prélevées dans la nature.

La souche B ainsi obtenue comprend, en fait, un mélange de sporidies (+) et (-), ainsi que des promycéliums et quelques téliospores dont le nombre diminue à chaque repiquage. A chaque passage sur milieu neuf, nous vérifions soigneusement le pouvoir de conjugaison des sporidies.

à) Isolement des clônes:

A partir du 7ème repiquage, nous avons constaté une diminution importante du taux de conjugaison. Ceci nous a incité à isoler de la souche B des clônes et à vérifier s'ils étaient compatibles ou non. De plus, il était plus intéressant de cultiver des souches pures où toutes les cellules sont de même signe, plutôt que d'entretenir une culture mixte et de risquer de perdre l'un ou l'autre des différents éléments du couple.

Nous avons prélevé 0,5 ml d'une suspension B âgée de sept jours, et l'avons diluée dans 200 ml d'eau distillée stérile. Une goutte de cette suspension diluée a été étalée sur du milieu de LESCURE gelosé contenu dans une boîte de Pétri.

Après huit jours à 21°C, de petites colonies blanchâtres apparaissent à la surface de la gélose; elles correspondent au développement des sporidies haploïdes qui, après isolement, se sont multipliées végétativement pour former un clône. I7 clônes ont été ainsi isolés.

b) Détermination de la compatibilité :

Après avoir isolé les I7 clônes, il nous a fallu déterminer ceux qui sont compatibles.

Pour montrer que deux clônes sont compatibles ou non, il suffit de mélanger à volumes égaux deux clônes, après les avoir mis en suspension. 24 heures plus tard, en observant ces mélanges, on peut vérifier l'homogénéité et la pureté des isolements.

Quand le mélange de deux clônes renferme des sporidies conjuguées, et que les cultures pures n'en contiennent pas, on peut en déduire que ces deux clônes sont compatibles, sans pouvoir préciser lequel est le (+) ou le (-). Si le mélange n'en renferme pas, c'est que les deux clônes sont du même signe.

G - METHODE D'ETUDE COMPAREE DE LA CROISSANCE DE DEUX CLONES COMPATIBLES ET D'UNE SOUCHE DE LA MYCOTHEQUE DE BAARN (HOLLANDE).

Parmi les clônes compatibles que nous avons isolés, nous en avons choisi deux (B.874 et B.974 : le premier chiffre représente le numéro d'isolement et les deux derniers chiffres, l'année d'isolement) que nous avons comparés à la souche provenant de la mycothèque de BAARN (438-34) pour déterminer leurs meilleures conditions de croissance.

Chaque colonie lévuroïde est mise en suspension dans IO ml d'eau distillée, à l'aide d'une pipette stérile; O,I ml sont prélevés puis introduits dans des fioles de 500 ml contenant 200 ml de solution nutritive préalablement autoclavée à I20°C pendant 20 mn. Les cultures sont alors placées sur une table agitatrice dans une pièce dont la température est réglée à 2I + I°C, éclairée I2 heures sur 24 par les tubes luminescents.

A la fin de la culture (I5 jours), le champignon est recueilli sur du papier-filtre, puis on détermine son poids frais, et son poids sec après séchage à IOO°C. Nous avons ainsi pu étudier l'importance des différentes sources de carbone et des divers éléments du milieu sur leur croissance.

H - METHODE DE CULTURE SIMULTANEE DU CHAMPIGNON ET DES TISSUS ISOLES DE SILENE ALBA.

Pour étudier l'interaction entre le champignon et le tissu isolé de <u>Silene alba</u>, nous ensemençons d'abord le champignon en trempant dans une suspension un anneau de fil de fer de 50 mm de diamètre, préalablement stérilisé à l'alcool, puis séché dans la flamme ; après avoir égoutté cet anneau, on l'applique contre la surface du milieu de culture, puis un fragment de tissu de silène (environ 250 mg) est déposé au centre de l'empreinte marquée sur le milieu contenu dans des boîtes de Pétri ; la distance séparant le tissu du champignon, au moment de la mise en culture, est ainsi toujours la même. Toutes les cultures sont placées dans une pièce dont la température est maintenue à 2I ± I°C. Elles reçoivent, en plus de la lumière du jour, un éclairement d'appoint fourni I2 heures sur 24 par des tubes luminescents.

- METHODE DE DOSAGE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES DES PROTEINES ET DES ACIDES AMINES LIBRES ET PROTEIQUES DANS UN FILTRAT DE CULTURE D'USTILAGO VIOLACEA.

L'expérience a été réalisée sur les trois souches précédentes. La culture est centrifugée à 3500 t/minute pendant 30 mn à 15°C.

Le culot sert à la mesure du poids frais, le poids sec est déterminé après séchage de 48 heures au four à IOO°C. Une partie du surnageant sert à doser les protéines totales par la méthode de LOWRY et coll. (I95I). Le détail de cette méthode est le suivant :

Faire une courbe étalon à partir d'une gamme de 10 à 200 % de serum albumine, et un témoin eau. Prendre 0,4 ml d'eau distillée ou de l'échantillon + 2 ml du mélange C.

 $\label{eq:Ajouter 0,2 ml du réactif de FOLIN-CIOCALTEU} \\ \mbox{dilué au I/3 dans l'eau :}$

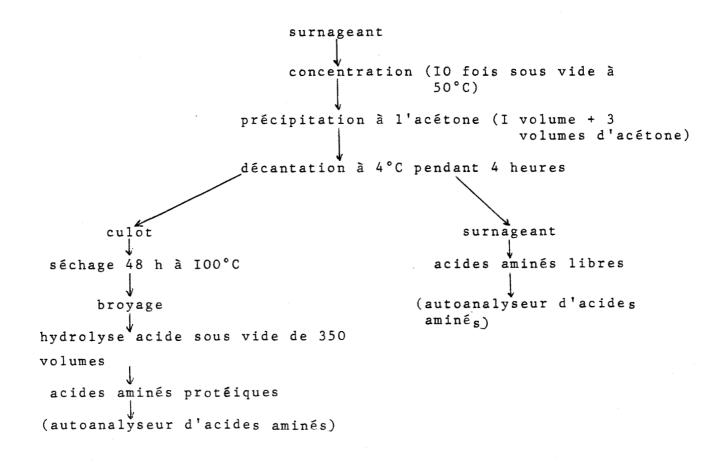
- coloration stable à l'obscurité pendant une journée,
- attendre 30 mn et lire au spectrophotomètre à 500 nm et 750 nm.

Une partie du surnageant sert à rechercher différentes activités enzymatiques par la méthode APIZYM, méthode semi-quantitative permettant de déterminer rapidement 19 activités enzymatiques à partir d'une faible quantité d'échantillon liquide.

Le principe est le suivant :

Hydrolyse d'un substrat par l'échantillon et libération d'un groupement chromogène (naphtol ou naphtylamine) et réaction de diazotation entre ce produit et un sel de diazonium (Fast bleu BB).

Une troisième partie du surnageant sert à déterminer les acides aminés libres et protéiques selon le protocole suivant :



J - METHODE D'INFECTION EXPERIMENTALE.

d) Préparation des inoculums :

Quatre types d'inoculums ont été utilisés pour infecter artificiellement les silènes.

D'abord une souche haploïde B.874 cultivée en milieu liquide agité. Après huit jours de culture, nous prélevons un volume de la suspension cellulaire que nous diluons au I/3 et nous l'inoculons à des plantules ou à des explantats.

Ensuite, nous avons réalisé un inoculum à partir des téliospores. Elles sont prélevées aseptiquement dans des fleurs obtenues <u>in vitro</u> à partir de fragments de tiges parasitées dans la nature. Elles sont concentrées dans de l'eau stérile, environ deux heures avant utilisation pour infecter des plantes en rosettes et des fragments de tiges saines.

Nous avons aussi réalisé un inoculum à partir des clônes compatibles B.874 et B.974 que nous mélangeons pour obtenir des sporidies conjuguées ou dicaryon. L'opération se fait de la manière suivante :

Les sporidies (+) et (-) âgées de 48 heures sont mélangées à volume égal en tenant compte de la concentration de la suspension, car les cultures très riches en sporidies sont défavorables à la formation des dicaryons. Le mélange est maintenu à 20°C dans des conditions aseptiques pendant 24 heures avant utilisation, de manière à obtenir un taux élevé (60 %) de dicaryons. Cet inoculum servira à infecter des plantules, des plantes en rosettes et des fragments de tiges saines de Silene dioica.

Enfin, nous avons tenté des infections à partir du mycélium dicaryotique. On considère jusqu'à maintenant que, seul, ce mycélium peut se développer à l'intérieur des tissus des silènes. Les travaux de HASSAN et MAC DONALD (1971) ayant montré que ce mycélium était plus abondant au niveau des noeuds que des entrenoeuds, nous avons réalisé l'infection en déposant des fragments de tissus découpés au niveau de noeuds de tiges parasitées (contenant donc le mycélium dicaryotique) sur des noeuds provenant de tiges saines.

b) Mode d'infection:

1) Les explantats:

Les explantats prélevés au niveau des noeuds de jeunes tiges saines sont infectés, soit en injectant à la seringue O,I ml d'inoculum (suspension de téliospores, de sporidies haploïdes ou de dicaryons) au niveau du bourgeon axillaire, soit en déposant sur les bourgeons, une goutte de l'inoculum, soit en trempant le noeud entier pendant 6 heures dans l'inoculum, soit enfin, par contact avec un fragment de tissu parasité.

2) Les plantules :

Les plantules de silènes ont été infectées par immersion complète pendant 6 heures, soit en trempant seulement les racines dans l'inoculum, soit en les immergeant entièrement. Une partie a été cultivée en serre et une partie <u>in vitro</u>.

3) Les rosettes :

Les rosettes provenant du développement des plantules saines ont été infectées par injection de l'inoculum, à l'aide d'une seringue. L'injection se fait au centre de la rosette, de façon à parasiter le bourgeon central.

Les plantules, après avoir été infectées expérimentalement, sont placées, certaines en champ ou en serre comme les plantes en rosettes, d'autres comme les fragments de tiges, sont cultivées aseptiquement sur un milieu gélosé renfermant du glucose (3 % dans le cas des plantules, 6 % dans celui des explantats), ainsi que les éléments nutritifs de la solution de MURASHIGE et SKOOG.

K - MATERIEL ET METHODES DE CYTOLOGIE.

Les bourgeons et les boutons floraux mâles et femelles proviennent de plantes cultivées en serre, dont un lot a été artificiellement parasité par des clônes compatibles d'<u>Ustilago violacea</u> isolés au laboratoire (BATCHO et ZAMBETTAKIS, 1976).

a) Techniques de microscopie optique (M.O.) :

Pour la microscopie optique (M.O.), les boutons sont fixés dans le fixateur de CARNOY (I887) durant 24 heures à 4°C, puis déshydratés dans la série éthanol-butanol tertiaire (méthode de JOHANSEN, I940) et inclus dans la paraffine selon le protocole suivant :

. Fixation (CARNOY, I887)

Ethanol absolu : 60 ml Chloroforme : 30 ml

Acide acétique glacial : IO ml

. Deshydratation : Les chiffres sont exprimés en ml.

!		:		:		:		:	···	:		1
!	Temps d'exposition	:	2 h	:	I h	:	I h	:	I h	:	I h	!
!	% approximatif d'alcool	:	50	:	7:0	:	85	:	95	:		!!
!	Eau distillée	:	50	:	30	:	15	:		:		!
!	Ethanol 95°	:	40	:	50	:	50	:	45	;		!
!	Butanol III	:	ΙO	:	20	:	35	:	5 5	:	75	!
<u>:</u>	Ethanol IOO°	<u>:</u>		: - <u>:</u>		: :		: :		:	25	!

Ensuite, 3 x I h dans le butanol tertiaire;

Ajouter un peu d'érythrosine 5 mn avant le début du paraffinage (permet de visualiser le matériel à travers le bloc de paraffine).

. Inclusion:

Tremper les coupes successivement dans deux mélanges :

- I mélange paraffine-butanol III (I/2 volume I/2 volume) pendant I heure,
- I mélange de paraffine pure (3 x I heure).

On inclut le matériel végétal dans les blocs. Les coupes sont réalisées au microtome à 7 à 10 μm d'épaisseur. Elles sont récupérées sur une lame, dans l'adhésif de HAUPT qui se prépare de la façon suivante :

- I g de gélatine pour IOO ml d'eau à 30°C + I5 ml de glycérol + 2 g de cristaux de phénol.

Mettre une couche d'adhésif sur une lame, ajouter quelques gouttes de formol 3 % pour permettre la flottaison des coupes pendant le déplissage.

Chauffer légèrement (sur une plaque) les lames pour déplisser les coupes.

Rejeter l'excédent de liquide et laisser sécher à l'air libre pendant une nuit.

. Déparaffinage :

Tremper les lames successivement dans la série 2 x IO mn (xylène); 3 mn (xylène-butanol III I/2, I/2); 2 x I mn (alcool IOO°); I x I mn (alcool 95°, 70°, 40°); puis eau distillée.

h) Mise en évidence du mycélium dicaryotique dans les tissus de l'hôte :

La coloration varie selon les éléments à mettre en évidence. Pour le mycélium, nous avons choisi la coloration à la thionine et à l'orange G de STOUGHTON (1930), permettant la mise en évidence de champignon et de bactérie dans les tissus végétaux.

La thionine est un colorant basique du groupe des Thiazines. Il se fixe électivement sur la mucine et révèle ainsi la présence du mycélium coloré en violet pourpre. La métachromasie au contact du cytoplasme de C.M.P. (cellules mères de grains de pollen) entraîne une coloration rose. Les acides nucléiques sont colorés en bleu. Les parois pectocellulosiques sont colorées en jaune par l'orange G.

Tremper les coupes dans une solution à I % de thionine, puis dans 5 % de phénol aqueux pendant une heure, puis rincer 3 mn dans l'eau, I mn dans l'alcool à 95° et à 100°, puis 2 mn dans le mélange suivant :

- I volume de solution saturée d'orange C dans l'alcool absolu,
- 2 volumes de solution saturée d'érythrosine dans Eugénol.

Ensuite: I mn dans l'alcool à 100°, 3 x 5 mn dans le xylène.

- Monter entre lame et lamelle dans du Xam GURRS,
- Laisser sécher dans une étuve à 60° pendant une nuit et observer.

C) Test de BRACHET:

Utilisé pour déterminer la vitalité des cellules mères de grain de pollen.

Dissoudre I,5 g de vert de méthyle
$$\left\{ \begin{array}{c} \text{dans 200 ml} \\ \text{d'eau} \\ \text{distillée} \end{array} \right.$$

Ajouter 20 ml de chloroforme, agiter quelques minutes, séparer le chloroforme dans une ampoule à décanter; recommencer cette opération jusqu'à ce que le chloroforme n'extrait plus le colorant violet. C'est la solution mère.

Les coupes sont immergées 5 mm dans le mélange suivant :

- 20 ml de la solution mère + 20 ml de tampon phosphate M/IO pH 4,5 à 5,5 + 60 ml d'eau distillée.

Résultat : 1'A R N est coloré en rouge 1'A D N est coloré en vert ou bleu-vert.

Ne pas oublier le témoin ARNase.

d) Mise en évidence des polysaccharides:

I) <u>Réaction de SCHIFF P.A.S.</u> (periodic-acide SCHIFF):

Préparation du réactif :

- Broyer I,5 g de fuschine basique; dissoudre dans 200 ml d'eau, ajouter I,5 g de métasulfite de potassium réduit en poudre, ajouter 3 ml d'HCl concentré ou 30 ml d'HCl normal; attendre I2 heures avant utilisation (se conserve peu de temps).

P. A. S. (selon Mc. MANUS, 1949):

- 5 mn dans 0,5 % d'ac. périodique ; laver à l'eau puis,
- -I5 mn dans le réactif de SCHIFF.
- Rincer 2 mn chaque fois dans trois bains d'acide sulfureux (IO ml d'HCl N + IO ml de bisulfite de sodium à IO % dilués jusqu'à 200 ml).
- Laver 5 mn à l'eau ; Coloration de fond facultative à l'hémalum,
- Lavage, déshydratation et montage.

Résultats : le P.A.S. est positif pour une coloration rouge pourpre due aux polysaccharides.

2) Bleu alcian:

Utilisé pour la mise en évidence des mucopolysaccharides très acides (sulfomucopolysaccharides). Les coupes sont immergées :

- 30 mn dans une solution de bleu alcian $8~{\rm GX}$
- IO mn dans un tampon citrate de sodium HCl pH 0,5.
- 3 x 2 mn dans l'eau distillée

- 30s dans le jaune alcian GX, puis 5 s dans un tampon citrate de Na - HCl pH 2,5 - I mn dans l'alcool IOO° et I mn dans le xylène.

Les mucopolysaccharides acides sont colorés en bleu, les mucosubstances non acides sont jaunes.

3) Chloroiodure de zinc :

Utilisé pour la mise en évidence de la cellulose. L'iode s'incruste dans la molécule de cellulose après rupture par un acide fort des liaisons hydrogènes qui maintiennent les structures.

- 30 g de chlorure de Zn + 5 g IK + I g $I_2 + I$ ml d'eau.

La cellulose est colorée en bleu violacé.

4) Test au phloroglucinol:

Utilisé pour la mise en évidence de la lignine.

Monter entre lame et lamelle les coupes dans quelques gouttes d'une solution aqueuse saturée de phloroglucinol dans HCl 20 %. La lignine est colorée en rouge violet (la préparation n'est pas permanente).

5) Bleu aniline:

Utilisé pour la mise en évidence de la callose. Les coupes sont immergées IO mn dans une solution aqueuse de 0,005 % de bleu aniline dans 0,15 M K₂HPO₄ pH 8,2. La coloration est immédiate et régresse après quelques heures. C'est un colorant vital. Les coupes sont montées dans une goutte du colorant. La préparation est observée au microscope à fluorescence. La callose apparaît en jaune.

6) Lugol:

Mise en évidence de l'amidon :

sur les coupes montées dans ce mélange, l'amidon est coloré en bleu foncé, les protéines en jaune.

7) Rouge de ruthénium:

Coloration des composés pectiques de la lamelle moyenne.

Immerger les coupes dans une solution aqueuse à I % de rouge de ruthénium.

Les composés pectiques sont colorés en rouge.

e) Mise en évidence des lipides :

J) Bleu de Nil:

Utilisé pour la mise en évidence des lipides neutres et des acides gras.

Coloration: IO à 20 mn dans une solution à I % de sulfate de bleu de Níl. Laver à l'eau et différencier à l'eau acétique à I % jusqu'à teinte uniforme. Rincer et monter.

Les lipides neutres sont rouges ou roses. Les acides gras sont bleus.

2) Noir soudan:

Utilisé pour la mise en évidence de tous les corps gras. Les coupes sont traitées 30 g dans l'alcool 30°, 5 à 30 mn dans une solution saturée de noir soudan dans l'alcool 60°; rincer 30 s dans l'alcool 60°; laver à l'eau et monter dans un milieu miscible à l'eau.

Tous les corps gras sont colorés en bleu-noir foncé.

3) Bleu de luxol:

Utilisé pour la mise en évidence des lipides acides.

Les coupes sont trempées 5 mn dans l'alcool à 95°, 8 heures à 60°C dans une solution à 0,I % de bleu de luxol ou bleu de méthasol solide 2 G dans l'alcool à 95°.

Rincer I mn dans l'alcool à 70°; passer à l'eau; différencier par une solution aqueuse à 0,05 % de carbonate de lithium; rincer à l'eau; déshydrater; monter: les lipides acides sont colorés en bleu.

f) Détermination des réserves protéiques :

La ninhydrine est utilisée pour la mise en évidence des acides aminés, des polypeptides et des protéines :

Les coupes sont plongées quelques minutes dans une solution de ninhydrine 0,2 à 0,4 % que l'on peut diluer à volume égal avec un tampon phosphate pH 7 et de concentration M/I5.

Les acides aminés, polypeptides et protéines sont colorés en bleu ou violet intense.

g) Microscopie électronique à transmission (M.E.T.) :

Pour les études réalisées en microscopie électronique, les boutons floraux et les bourgeons de silône sains et parasités ont été fixés par une solution de glutaraldéhyde à 5 % dans un tampon cacodylate (pH 7,2) durant deux heures. Après rinçage dans le tampon, ils ont été postfixés durant une heure dans une solution de tetroxyde d'osmium à 2 % tamponné par le véronal sodique. Toute la fixation est réalisée à la température du laboratoire (2I + I°C). Ces boutons floraux sont ensuite inclus dans l'araldite selon le protocole habituel (GLAUERT et GLAUERT, 1958). Les coupes ultra-fines contrastées soit par l'acétate

d'uranyle-citrate de plomb, soit par la technique de THIERY (1967) pour la mise en évidence des polysaccharides, ont été observées sous une tension de 50 Kv avec un microscope HITACHI HS 8.

En outre pour permettre de situer avec précision nos observations en M.E.T., nous avons systématiquement pratiqué des coupes semi-fines (I μm) que nous avons colorées par 1e bleu de toluidine, selon la méthode de GRIMLEY et coll. (1965).

I) Fixation:

Le mélange fixateur se fait juste avant utilisation.

- I volume d'une solution aqueuse à 25 % de glutaraldéhyde,
- + 4 volumes de tampon cacodylate pH 7,5 (I,42 g pour IOO ml d'eau),
- + I volume d'eau.

Immerger les pièces pendant deux heures pour les bourgeons et les boutons floraux et I2 heures pour les microspores et les grains de pollen.

Rincer trois fois (2 h, I h et toute la nuit à 4° C) dans le tampon cacodylate.

2) Postfixation :

Mélanger à volume égal quelques millilitres de la solution d'OsO $_4$ à 2 % dans du tampon acétate-véronal.

3) Préparation du tampon :

- $^{\text{P}}$) Solution d'acétate de sodium 0,14 M: I,904 g de CH $_3$ COONa, 3 H $_2$ 0 dans 100 ml d'eau
- 2°) Solution de véronal sodique : 2,58 g de véronal sodique dans IOO ml d'eau
- 3°) HC1 O, I N

Le tampon s'obtient en mélangeant : IO ml solution (I) + 10 ml solution (2) + 20 ml d'eau, le tout ajusté à pH 7,4 par la solution (3).

Les solutions mères se conservent assez longtemps à froid.

Fixer les pièces pendant 2 heures en agitant de temps en temps. Ensuite, faire 3 rinçages de I5 mn chacun dans l'eau distillée.

Déshydratation:

Dans la série éthanol (25°, 50°, 70°, 80°, 95°, 2 x 100°) pendant une heure chacun et toute une nuit dans l'éthanol. À 100°C.

Milieu d'inclusion (GLAUERT et GLAUERT, 1958) :

Mélanger IO mlaraldite + IO ml durcisseur + I ml phtalate de butyle + 0,55 ml accélérateur.

4) Bains d'inclusion:

- I volume d'éthanol IOO° + I volume d'oxyde de propylène 45 mn.
- trois bains de I heure chacun dans l'oxyde de propylène pur,
- une heure dans le mélange (3/4 oxyde de propylène + I/4 araldite),
- une heure dans le mélange (I/4 oxyde de propylène + 3/4 araldite),
- 30 mn à l'étuve 48°C.

Inclusion dans des gélules, puis remise à l'étuve pendant trois jours. Les coupes ultra-fines et semi-fines sont réalisées à l'ultramicrotome OmU₂ avec des couteaux de verre. Elles sont reprises sur grille en cuivre.

Les coupes semi-fines (I µm) sont colorées par le bleu de toluidine selon GRIMLEY et coll. (1965). Les coupes ultra-fines sont contrastées soit par l'acétate d'uranyle-citrate de plomb, soit par le KMnO₄ ou le test de THIERY (1967).

5) Test de THIERY (1967) :

Tremper les coupes 30 mn dans l'acide périodique I %. Lavage soigné dans l'eau distillée; tremper pendant 5 heures dans du thiosemicarbazide (T S C) à I %, puis rincer dans l'acide acétique IO % et dans l'eau distillée. Tremper dans une solution de protéinate d'argent à I % pendant 30 mn à l'obscurité.

Contrôle : remplacer l'acide périodique par ${\rm H_2^{0}_2}$ IO % pendant 30 mn.

6) Acctate d'uranyle-citrate de plomb

Tremper les coupes dans une solution d'acétate d'uranyl 5 % dans l'alcool à 50° pendant I5 à 30 mn (à 1-'obscurité). Rincer à l'alcool à 50° avec une pipette.

Tremper dans une solution de citrate de plomb (REYNOLDS) pendant 5 mm, Layage à 1 eau,

7) $KMnO_4$:

Tremper les coupes dans une solution aqueuse de KMnO₄ à I %. Lavage à l^reau bidistillée, puis à l'acide citrique à 0,5 % pendant 30 s puis deux fois à l'eau.

Toutes les coupes ultra-fines sont observées sous une tension de 50 Kv sur un microscope électronique HITACHI HS 8. Les coupes semi-fines sont observées en microscopie optique.

h) Méthode de détermination des acides aminés libres à partir de fragments de tiges de Silene alba et S.dioica :

Récolter une certaine quantité de fragments de tiges à conserver dans l'éthanol 95° pendant 7 jours. Filtrer, évaporer l'alcool. Reprise dans 50 ml d'eau distillée pour 100 g de matériel frais. Ajouter 50 ml d'acétate d'éthyle agiter l'ensemble ; séparer ; recommencer deux fois (l'acétate d'éthyle élimine la chlorophylle).

Ajouter 50 ml de chloroforme à la fraction eau ; agiter ; décanter ; séparer ; recommencer trois fois. Le chloroforme précipite et élimine les protéines.

Si la fraction eau reste trouble, filtrer ou centrifuger; le surnageant renferme les acides aminés libres qui sont identifiés par un autoanalyseur,

CHAPITRE III

GERMINATION ET ASEPTISATION DES TELIOSPORES D'U. VIOLACEA

Pour étudier les relations hôte-parasites entre Ustilago violacea et Silene alba et S. dioica, dans des conditions d'asepsie rigoureuse, il nous a fallu d'abord étudier in vitro le développement de la phase haploïde, saprophytique, du cycle du champignon ; cette phase étant la seule du cycle, actuellement capable de proliférer en milieu synthétique, et nous permettant d'obtenir des inoculums à pouvoir pathogène suffisant pour réaliser des infections artificielles. Elle s'obtient par la germination des téliospores.

A - GERMINATION DES TELIOSPORES.

Le taux de germination des téliospores, ainsi que le pourcentage des sporidies conjuguées, ont été évalués après I2 heures de culture (tableau I) et après 5 jours (tableau 2).

! : : : : : : : : : : : : : : : : : : :	GERMINATION :	CONJUGAISON !
! Eau	39 <u>+</u> 3 %	23 + 3 %
! MURASHIGE et SKOOG :	35 <u>+</u> I % :	24 <u>+</u> I %
SABOURAUD	16 + 3 %	36 <u>+</u> I %
! LESCURE :	39 + 2 % :	26 <u>+</u> 2 % !

<u>Tableau I</u>: Pourcentage de germination des téliospores et conjugaison des sporidies compatibles après I2 heures de culture.

! : MILIEUX DE CULTURE : !	GERMINATION	: CONJUGATION :
! Eau	69 <u>+</u> 4 %	: I4 + 3 %
! MURASHIGE et SKOOG :	43 <u>+</u> 2 %	: 10 <u>+</u> 1 %
SABOURAUD	56 <u>+</u> 3 %	8 + 2 %
! LESCURE :	59 <u>+</u> 3 %	: I3 + 2 % !

<u>Tableau 2</u>: Pourcentage de germination des téliospores et conjugaison des sporidies compatibles après 5 jours de culture.

Les téliospores récoltées dans la nature germent assez bien dans tous les milieux étudiés (tableaux I et 2). L'eau, les milieux de MURASHIGE et SKOOG et de LESCURE sont les milieux qui assurent une meilleure germination après I2 heures de culture. Le milieu de SABOURAUD est plus favorable à la conjugaison pendant le même temps (tableau I). Dans tous les cas, le taux de germination augmente au bout de 5 jours ; il n'en est pas de même pour la conjugaison dont le taux baisse d'une façon générale, mais surtout dans la solution de SABOURAUD (tableau 2).

Les téliospores, en germant, produisent un promycélium qui se divise le plus souvent en deux ou trois cellules, sur lesquelles se forment les sporidies. Une fois libérées, celles-ci s'anastomosent deux à deux pour constituer un dicaryon (PL.I - fig. I). Selon HASSAN et MAC DONALD (1971) la germination peut s'observer dans l'eau au bout de 6 heures; toutefois, dans nos expériences, ces téliospores ne germent qu'après I2 heures (tableau I), ce qui indique que la conservation (six mois au laboratoire) retarde cette germination et explique qu'après cinq jours (tableau 2), le taux de spores en germination soit encore élevé.

Après leur formation, les promycéliums se détachent très vite et tombent au fond des microcuvettes avec les sporidies. Une même spore peut produire deux promycéliums à la fois ; les anastomoses s'effectuent, non seulement entre deux sporidies, mais aussi entre sporidies et cellules promycéliennes d'origines différentes.

Lorsque la suspension de sporidies est dense, on peut observer la conjugaison entre trois sporidies différentes (PL.I - fig. 2, 3); inversement, quand les suspensions sont pauvres, les conjugaisons ont plus de mal à se produire (PL.I - fig. 6, 7); parfois elles ont lieu par de longs canalicules qui unissent deux sporidies compatibles. Après 5 jours de culture, le taux de conjugaison diminue, en raison peut-être de l'encombrement important de promycéliums qui gênent le déplacement des sporidies et provoquent leur asphyxie.

Les sporidies non-conjuguées, comme les cellules levuroïdes, se multiplient activement par bourgeonnement (PL.I - fig. 6); l'eau distillée, seule, quoique permettant une bonne germination, est incapable d'assurer la prolifération.

Dix jours plus tard, sporidies et promycéliums constituent une masse pâteuse de couleur blanchâtre dans les solutions nutritives de MURASHIGE et SKOOG et de LESCURE, ou jaunâtre sur celle de SABOURAUD.

D'une manière générale, on peut noter que la germination des téliospores d'<u>Ustilago violacea</u>, avec toutes les phases qu'elle comporte, est possible dans tous les milieux utilisés; toutefois, après IO jours, toutes les cultures, à l'exception de celle réalisée dans l'eau, sont envahies par les bactéries, ce qui pose le problème de l'aseptisation des téliospores.

B - DESINFECTION DES TELIOSPORES RECOLTEES DANS LA NATURE.

Après avoir constaté que les téliospores récoltées dans la nature portent toujours des bactéries, et qu'une désinfection superficielle du bouton floral non encore épanoui n'élimine pas les bactéries, nous avons pensé nous en débarrasser en cultivant les téliospores en présence d'antibiotiques.

Les microcuvettes de culture sont maintenues pendant 24 heures à la température du laboratoire.

La streptomycine (tableau 3) n'inhibe pratiquement pas la germination des téliospores mais, dans nos conditions expérimentales, elle laisse subsister les bactéries. Le chloramphénicol, la terramycine et la polymyxine également utilisés à la dose de 10^{-4} g/ml réduisent considérablement la germination. On assiste souvent à l'éclatement des téliospores et les germes bactériens subsistent, sauf en présence de polymyxine (BATCHO, 1973). Nous avons donc tenté de réduire la dose de ce dernier composé, afin d'améliorer le taux de germination (tableau 4).

! streptomycine g.1 ⁻¹ !	10-3	10-4:	10 ⁻⁶ :	10-8 !
germination	: 48 <u>+</u> 2 %:79	± 4 %:80 :	<u>+</u> 2 %:80	± 3 % ! !
! bactéries !	: : : : : : : : : : : : : : : : : : :	: +++ : :	+++ :	! +++ ! !

<u>Tableau 3</u>: Influence de la streptomycine sur la germination des téliospores d'<u>Ustilago</u> violacea.

+++ : présence de bactéries.

! ! polymyxine g.1 ^{-I} !	: : 5.10 ⁻⁵	10 ⁻⁵ :	10-6
! germination !	: :I + 0,5 %	: : I <u>+</u> 0,5 %: :	30 <u>+</u> I % !
! bactéries ! !	: 0 : 0	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	! +++ ! !

Tableau 4: Influence de la polymyxine sur la germination des téliospores d'Ustilago violacea.

Des concentrations de l'ordre de ${\rm IO}^{-5}$ g. ${\rm I}^{-1}$ de polymyxine sont encore efficaces, mais le taux de germination est

extrêmement faible; il ne s'améliore qu'en présence d'une solution plus diluée (IO⁻⁶) qui, alors, n'est plus efficace pour éliminer les bactéries. La prolifération des bactéries est rapide (7 ou 8 heures), alors que la germination des spores du champignon est plus lente et nécessite une dizaine d'heures. Nous avons donc réduit le temps de contact des spores avec une solution de polymyxine à IO⁻⁵ (tableau 5), en espérant que les bactéries seraient réduites en temps limité, et qu'en replaçant, après rinçage, les spores dans l'eau distillée, elles pourraient germer convenablement en condition aseptique.

En 7 heures, la polymyxine IO⁻⁵ g.I^{-I} n'élimine pas les bactéries ; après IO heures, son pouvoir bactéricide est efficace, mais le taux de germination des téliospores est considérablement réduit. Ces différentes méthodes étant peu satisfaisantes pour désinfecter les spores récoltées dans la nature, nous avons alors utilisé un mélange dihydrostreptomycine-bipénicilline I g/I M dont le spectre d'activité antibactérienne est assez large (tableau 6).

! ! Temps d'exposition en ! heures	7	10	: ! : 20
! ! Germination !	: : 80 <u>+</u> 3 :	% : 2 <u>+</u> I %	: 2 + I % ! : 2 + I % !
! ! Bactéries !	: : +++ :	: : 0 :	: ! : 0 ! : !

Tableau 5 : Après I2 heures de culture, germination des téliospores ayant séjourné 7, I0 et 20 heures dans la solution de polymyxine.

! !antibiotique ! g/ml	0	10 ⁻³	2.10 ⁻³	5.10 ⁻³	10-2	2.10 ⁻²	5.10 ⁻² !
! !taux de !germination !	80 <u>+</u> 3%	30 <u>+</u> 1%	33 <u>+</u> 1%	3I <u>+</u> 2%	35 <u>+</u> 2%	25 <u>+</u> 1%	0 + 1%
! !bactéries !	: : +++ :	: : 0 :	0	0	0	0	: ! : 0 !

Tableau 6: Action du mélange dihydrostreptomycinebipénicilline sur la germination des téliospores d'<u>Ustilago violacea</u> après I2 heures de culture.

La dihydrostreptomycine-bipénicilline se révèle efficace dans nos conditions expérimentales (${\rm IO}^{-3}$ g/ml), mais le taux de germination est réduit (tableau 6). De plus, à ces concentrations, les conjugaisons sont rares et anormales.

Pour tenter d'éviter ces anomalies morphologiques, nous avons prélevé des suspensions de téliospores mises à germer en l'absence d'antibiotiques ; nous les avons réparties à raison de I ml par microcuvette en présence de concentrations d'antibiotiques comprises entre 10^{-1} et 10^{-3} g/ml.

Dans ces conditions, les bactéries sont détruites après un traitement de I2 heures, et les sporidies ne présentent pas de modifications morphologiques, mais, des champignons autres qu'<u>Ustilago</u> violacea se développent dans les cultures.

Cette méthode n'est donc pas plus satisfaisante que les précédentes ; si le mélange dihydrostreptomycine-bipénicilline a un pouvoir bactéricide certain, il est, à fortes concentrations, défavorable à la germination des spores et, à faible concentration, ne permet pas une culture rigoureusement axénique.

Deux moyens sont alors possibles pour éliminer les bactéries; soit par micromanipulation, soit par les techniques de culture in vitro qui feraient fleurir des tiges parasitées afin d'obtenir des fleurs charbonnées. Nous avons opté pour cette dernière méthode.

CHAPITRE IV

FLORAISON DE SILENE ALBA ET S.DIOICA

Nous avons entrepris d'étudier les conditions de floraison de <u>Silene alba et S.dioica</u>, d'abord pour préciser certaines caractéristiques de la biologie de ces plantes dioïques, mais surtout, pour tenter de les faire fleurir <u>in vitro</u> et, éventuellement, réaliser des infections artificielles dans des conditions contrôlées.

A - CULTURE DES PLANTES ENTIERES.

a) en champ:

Les graines de <u>Silene alba</u> et <u>S.dioica</u> récoltées sur des plantes saines, germent dans la terre et produisent des plantules de 2 cm environ au bout de deux semaines. Ces plantules, repiquées en champ à la fin de l'automne, évoluent rapidement en rosettes, puis restent dans cet état pendant tout l'hiver. Les rosettes montent et fleurissent au printemps et durant l'été. En dehors de ces considérations générales, observées aussi bien chez <u>Silene dioica</u> que chez <u>S.alba</u>, il faut préciser que dans la nature, <u>Silene dioica</u>, variété à fleurs roses, est une plante d'ombre que l'on rencontre dans les sous-bois, alors que <u>S.alba</u> est presque toujours exposée dans les champs et au bord des routes.

b) en serre :

Les plantules de <u>Silene alba</u> placées en serre, éclairées I2 heures par jour, forment des rosettes et restent à ce stade pendant une durée variable, fonction essentiellement de la température ambiante. En effet, les plantules obtenues en Octobre, restent en rosettes pendant tout l'hiver et commencent à monter au mois de Mars. Celles qui sont mises en culture en Février fleurissent en Mai. Celles obtenues en Avril sont en fleurs au mois de Juin.

Il suffit d'ailleurs, en plein hiver, de placer des rosettes à 25°C pour obtenir leur floraison deux semaines plus tard.

En général, les pieds femelles sont plus vigoureux que les pieds mâles, mais leurs fleurs s'ouvrent plus tardivement. Silene alba peut rester en serre pendant plusieurs années en produisant des fleurs chaque été.

Les plantules de <u>Silene dioica</u> évoluent aussi en rosettes, mais restent à ce stade pendant deux ans avant de fleurir. Les plantes en fleurs sont rabougries et portent de nombreuses fleurs à pétales atrophiés. Leur développement est plus normal à partir de la troisième année de culture en serre.

c) culture aseptique des plantules :

Des plantules de <u>Silene alba</u> sont cultivées aseptiquement à différentes températures. Pour chaque température, les boutons floraux ou les fleurs ouvertes sont dénombrés. Une moyenne a été calculée à partir de trois expériences de IO paniers (24 tubes par panier). Les résultats sont examinés après 30 jours de culture.

<u>Tableau 7</u>: Effet de la température sur la floraison <u>in vitro</u> des plantules de <u>Silene alba</u>:

! ! Température !	: : I5°	: : 2I°	25°	: 30°!
Boutons floraux par plantule	: : I	: : I,7I :	2,02	I,53
Fleurs ouvertes par plantule	: : 0	: : 0,08	0	0 !

A I5°, les plantules restent rabougries, avec des entre-noeuds très réduits. Elles ne produisent pas de boutons floraux jusqu'à la fin de l'expérience. A 2I°, très peu sont restées en rosettes. Celles qui se développent sont plus grêles

avec des feuilles moins larges que celles des plantules cultivées en serre ou en champ. Seul un tube de culture portait trois fleurs parfaitement épanouies, alors que nous avons observé une moyenne de I,7I boutons par plante (tableau 7).

Les températures de 25 et 30° provoquent une croissance rapide des tiges qui atteignent le sommet des tubes de culture, se courbent et se cassent dans certains cas. A ces températures, seuls les boutons floraux ont été observés ; ils sont d'ailleurs plus nombreux à 25° qu'à toutes les autres températures (tableau 7).

Les observations faites sur des plantes récoltées dans la nature nous ont montré la présence de téliospores d'<u>Ustilago violacea</u> dans des boutons floraux très jeunes.

Il n'était donc pas nécessaire d'obtenir la floraison complète pour étudier le phénomène de castration provoqué par ce parasite sur les silènes.

Néanmoins, nous avons repris cette étude à partir des fragments de tiges comportant un noeud et un ou deux bourgeons axillaires.

B - CULTURE DES FRAGMENTS DE TIGES SAINES DE SILENE ALBA.

Les travaux de DUBOIS et BOURIQUET (1974) montrent que des explantats prélevés au niveau des noeuds de <u>Silene alba</u> cultivés sur le milieu minéral de HELLER gélosé, avec 5 % de glucose, ne produisent ni cal, ni racine. Mais, les bourgeons axillaires évoluent rapidement en tiges feuillées qui, après 15 jours, comprennent généralement trois entre-noeuds et portent un ou deux boutons floraux. Après un mois de culture, les tiges feuillées remplissent le tube de culture et la plupart des boutons floraux se nécrosent.

A la suite de ces recherches, nous avons tenté d'améliorer les conditions d'obtention des fleurs en variant la teneur en glucose (6 %) et aussi la température (2I \pm I°C); puis, surtout, nous avons fait une étude comparée de la culture des fragments de noeuds sur le milieu nutritif préconisé par

MURASHIGE et SKOOG et sur celui de HELLER, pour réduire le développement végétatif de la plante sans inhiber la floraison. Sur ces deux milieux, les fragments de tiges comportant un noeud et un à deux bourgeons axillaires sont repiqués en position normale, après avoir été aseptisés.

La différenciation des premières feuilles s'observe dès le 3ème jour de culture, et le pourcentage de reprise est comparable sur les deux milieux. Ce pourcentage est, par contre, variable selon le lieu de prélèvement des explantats. La reprise est plus lente et plus difficile avec des fragments provenant des régions âgées plus lignifiées des tiges, que pour ceux prélevés dans les régions jeunes.

Tous les fragments qui ont repris ont produit plus d'un bouton floral (tableau 8). Ces boutons sont plus nombreux sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG, après 30 jours de culture : 6 en moyenne par explantat provenant des pieds mâles et 4 sur ceux prélevés sur les pieds femelles (tableau 8).

! ! MILIEU DE CULTURE!	: MURASHIGI	E ET SKOOG:	HELLER			
Sexe des explantats	MALE	FEMELLE	MALE	FEMELLE		
! Pourcentage de !reprise	82 %	91 % :	81 %	: : 87 % :		
! !Fleurs ouvertes !par explantat	0,55	0,69	0,34	: : 0,20 :		
Boutons nécrosés par explantat	0,42	0,5I :	0,11	: : 0,34 :		
Nombre de boutons par explantat	6,01	4,II :	2,12	: : 1,21 :		
Teneur en chlorophylle	+++	+++ :	++	: : ++ :		

<u>Tableau 8</u>: Action comparée du milieu nutritif de MURASHIGE et SKOOG et celui de HELLER sur la floraison in vitro des fragments de tige de <u>Silene alba</u>

- +++ très chlorophyllienne
 - ++ peu chlorophyllienne

De plus, sur ce milieu, le nombre de boutons capables de s'épanouir en fleurs est plus important (PL.II fig. 4). Il arrive souvent que les boutons floraux se forment ou que des fleurs s'ouvrent directement au niveau des noeuds, sans développement important de tiges néoformées (PL.II fig. I et 2). Mais, généralement, il apparaît deux à trois entre-noeuds avant la floraison (PL.II - fig. 5). Les tiges formées in vitro sont vigoureuses avec des feuilles très chlorophylliennes. Elles ont une longueur moyenne de 4 cm à cause de la réduction des entre-noeuds. La floraison se poursuit, même après deux mois sur les ramifications des tiges. Le parfait épanouissement des fleurs femelles (PL.II - fig. 4 et 6) ou mâles (PL.II - fig. 2), et leur nombre important par explantat, montrent que ce milieu et les conditions de température, de lumière, en plus du taux de glucose, sont sans doute favorables à la floraison de Silene alba.

Le milieu de HELLER permet plus rarement la production de fleurs et très peu par explantat (PL.II- fig. 3). Le nombre de boutons est plus faible, les tiges sont plus grêles et les feuilles moins chlorophylliennes. La nécrose généralisée qui intervient après trois semaines environ de culture, montre que ce milieu, qui est essentiellement minéral, est moins favorable à la floraison.

Alors que dans la nature, des plantes en fleurs ont une taille de 80 cm environ (PL.X - fig. 5), les techniques de culture in vitro nous ont permis d'obtenir, sur un milieu dépourvu de phytohormone et en photopériode longue, la floraison de Silene alba dans des conditions satisfaisantes. L'induction florale étant réalisée dans la nature à partir de plantes entières, nous avons seulement réduit le développement végétatif des fragments de tiges, en tenant compte de la taille de nos tubes de culture (16 cm), sans inhiber la floraison.

Les travaux de WELLENSICK (1975), puis ceux de CLELAND et ZEEVAART (1970) ont montré que, chez certaines silènes, la floraison et l'élongation des tiges sont deux processus différents, séparément contrôlables. L'obtention in vitro de fleurs de Silene alba, sans développement important de pédoncule floral (4 cm) confirme les observations de ces auteurs.

C - ORTENTION IN VITRO DES FLEURS DE SILENE ALBA ET S.DIOICA PARASITEES PAR USTILAGO VIOLACEA.

Les travaux de MOREL (1948) indiquent que la culture d'organes contenant le mycélium parasite est un moyen d'obtenir in vitro, la culture de ce parasite. Après avoir défini les conditions de floraison in vitro des fragments de tiges provenant de plantes saines, nous avons repris la même expérience à partir des fragments de tiges provenant de plantes parasitées dans la nature, en espérant que les fleurs obtenues in vitro seraient charbonnées.

a) Silene dioica parasité :

Oue les fragments de tiges proviennent de pieds mâles ou femelles, leur développement est rapide (environ 7 cm en I5 jours) (PL.III - fig. 2). La vigueur de ces tiges, la taille et la couleur des feuilles formées <u>in vitro</u> sont très peu affectées par la présence du champignon. Le nanisme des plantes parasitées signalé par BAKER (1948), puis EVANS et WILSON (1971) n'est donc pas un phénomène général.

Comme pour les plantes saines, des boutons floraux et des fleurs apparaissent sans un développement végétatif important (PL.III - fig. I, 3, 5). Les deux expériences que nous avons réalisées, comportant chacune IO paniers de 24 tubes de culture, ont permis de constater que les premières fleurs charbonnées apparaissent environ I3 jours après la mise en culture. Nous avons dénombré les fleurs parasitées (tableau 9) au bout de 30 jours.

Les explantats prélevés sur les pieds mâles produisent plus de fleurs (ou de boutons floraux) (PL.III - fig. 2) que ceux provenant de pieds femelles (PL.IV - fig. 4 et 6); ils sont d'ailleurs plus précoces, ce qui confirme ce que nous avons observé pour les fleurs saines et dans la station où nous avons récolté les plantes parasitées.

! SEXE!	: MALE	: ! : FEMELLE ! : !
! Pourcentage de reprise des ! explantats !	87 %	: ! : 81 % ! : 1
Pourcentage d'explantats ayant produit des fleurs	: : 85 %	: 80 % ! : 80 % !
! Pourcentage d'explantats portant ! des fleurs parasitées !	73 %	: 42 % ! : 42 % !
! Nombre moyen de fleurs épanouies ! par explantat	: : 6 :	: ! : 2,4 ! : !
! Nombre moyen de boutons floraux ! par explantat !	3	: I

<u>Tableau 9</u>: Etude de la floraison <u>in vitro</u> de fragments de noeuds de <u>Silene dioica</u> parasitées.

Parmi les fleurs obtenues <u>in vitro</u>, 73 % des mâles (PL.III) et 42 % des femelles (PL.III) manifestent la présence d'<u>Ustilago violacea</u>. Ces fleurs ont des pièces périanthaires (5 sépales, 5 pétales) normales, mais la morphologie de leurs pièces reproductrices est profondément modifiée par la présence du champignon. Les fleurs mâles ont des anthères qui renferment les téliospores d'<u>Ustilago violacea</u> à la place des grains de pollen. Les fleurs femelles ont un ovaire réduit et stérile, tandis que les organes mâles, habituellement atrophiés, se développent en étamines (remplies de téliospores), qui leur donnent l'aspect de fleurs hermaphrodites. Ces observations sont analogues à celles réalisées dans la nature, sur des plantes entières (BAKER, 1948).

Signalons enfin que certains explantats, bien que provenant de plantes parasitées, ont produit des fleurs saines, ce qui laisse supposer que, sur une plante parasitée, il peut exister des rameaux indemnes.

b) Silene alba parasité:

Dans des conditions analogues à celles utilisées pour <u>Silene dioica</u>, nous avons cultivé des explantats prélevés sur des tiges parasitées de Silene alba (tableau IO - PL.IV).

! ! SEXE !	: MALE	: ! : FEMELLE ! : !
! Pourcentage de reprise des ! explantats	90 %	: ! : 88 % ! : !
Pourcentage d'explantats ayant produit des fleurs	: : 25 %	: 58 % ! : 58 % !
! Pourcentage d'explantats portant ! des fleurs parasitées !	85 %	: 78 % ! : 78 % !
Nombre moyen de fleurs épanouies par explantat	: : I,42 :	: ! : I,3I ! : !
! Nombre moyen de boutons floraux ! par explantat !	5,60	4,25

Tableau IO : Etude de la floraison <u>in vitro</u> de fragments de noeuds de <u>Silene alba</u> parasité.

Les premiers boutons floraux apparaissent après

15 jours de culture, mais se nécrosent le plus souvent. Par
contre, ceux qui se forment ultérieurement sur des pousses
latérales donnent des fleurs charbonnées (PL.IV - fig. I, 2).

Avec cette espèce, les résultats sont moins spectaculaires qu'avec <u>Silene dioica</u>, car la floraison obtenue in vitro est moins abondante.

Quoi qu'il en soit, 85 % des pieds mâles et 78 % des pieds femelles étaient parasités par <u>Ustilago violacea</u> après deux mois de culture.

Ustilago violacea se développe donc <u>in vitro</u> comme dans les conditions naturelles. Jusqu'à présent, il semble que l'on n'ait pu cultiver ce champignon sur milieu synthétique que sous sa forme asexuée, lévuroïde ; il se multiplie alors par bourgeonnement.

La méthode que nous venons de mettre au point permet d'obtenir dans un temps relativement court (deux semaines), et dans des conditions aseptiques, des fleurs parasitées de silène; en 1971, HASSAN et MAC DONALD avaient étudié le phénomène en cultivant les plantes parasitées dans la nature; ils n'obtenaient les fleurs charbonnées que cinq à dix mois plus tard.

Soulignons enfin que notre méthode permet de recueillir aseptiquement des téliospores et résout ainsi le problème de leur désinfection.

CHAPITRE V

COMPATIBILITE ET CROISSANCE DES SPORIDIES

Les méthodes de culture <u>in vitro</u> des plantules ou de fragments de tiges de silène nous ayant permis d'obtenir des téliospores dans des conditions aseptiques, il nous était possible d'envisager leur culture pure, d'étudier les conditions de croissance et de conjugaison chez ce champignon, et de réaliser des inoculums pour infecter les plantes saines.

A - COMPATIBILITE DES SPORIDIES.

Les téliospores obtenues <u>in vitro</u> germent et se transforment en une suspension blanchâtre, régulièrement entretenue sur le milieu de LESCURE. Cette culture constitue la souche B à partir de laquelle I7 clônes ont été isolés. Nous avons apparié ces clônes 2 à 2 et, 24 heures plus tard, identifié les mélanges renfermant des sporidies conjuguées (tableau II).

!		:	:	•	:	:	:	:	:	!
!	couples	:I-I5	2-20	4-8	6-17	7-18	8-9	10-11	12 –13	16-19
!		:	:	:	:	:	:	:	:	: !
!	dicaryon	: 00	; œ	: 0 0	: 00	: œ	: 00	: 00	: 00	00!
!		:	:	•	:	•	:			
!		<u>:</u>	<u>: </u>	:	:	•	:			<u> </u>

<u>Tableau II</u>: Détermination des clônes compatibles d'Ustilago violacea.

- oo clônes compatibles
- o o clônes non-compatibles

Parmi les clônes compatibles, nous en avons choisi six pour une étude de polarité des sporidies (tableau I2).

! N°	i	6	8	9	15	I7 !
! !	0 0	00	∞	0 0	∞	0 0
! 6	ω	0 0	0 0	OC	0 0	00
! 8	∞	0 0	0 0	ω	0 0	∞ !
9	0 0	ω	∞	0 0	00	0 0
! 15	ω	00	0 0	œ	0 0	ω !
! .17	0 0	00	ω	0 0	ω	0 0

Tableau I2 : Etude de la polarité entre 6 clônes

∞ clônes compatibles

o o clônes non-compatibles

Sur les 36 combinaisons possibles avec les 6 clônes compatibles, I8 mélanges contiennent des conjugaisons, soit 50 % du total. Il semble donc que, d'une manière générale, pour deux couples compatibles, la sporidie (+) du premier puisse se conjuguer avec la sporidie (-) du second, et vice versa. Elles sont donc bipolaires.

De tous les clônes compatibles isolés, nous n'avons conservé (par repiquages réguliers) que les B.174; B.1574, puis les B.874 et B.974; ces deux derniers ont été plus particulièrement étudiés.

B - CROISSANCE DES SPORIDIES SUR DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURE.

Après isolement des clônes et détermination de leur compatibilité, il était nécessaire de rechercher le milieu favorable qui permettrait de les conserver longtemps en culture. En conséquence, nous avons étudié la croissance des deux clônes compatibles B.874 et B.974 que nous avons comparés à un autre clône de la mycothèque de BAARN (Hollande), et qui porte le numéro 438-34. Ce dernier, isolé en 1934 (PL.X - fig. 6) a perdu tout pouvoir pathogène. Les mêmes milieux utilisés pour

la germination des téliospores ont été repris ici pour la croissance des clônes, afin de déterminer lequel assurerait aussi bien la prolifération du champignon que celle de son hôte.

Les résultats, après trois semaines de culture, sont réunis dans le tableau I3.

! !	•		s o u	СНЕ	S	!
! MILIEUX NUTRITIFS	438-34		B.974		B.874	
!	PF	PS	PF	PS	PF	PS!
! SABOURAUD!	: 5,860:	I,480	4,950	: :I,073	4,881	! !,066!
MURASHIGE et SKOOG complet	:5,450:	1,190	4,493	0,981	4,238	0,125! !
! ! LESCURE !	:5,484:	I,198:	: :4,378:	: :0,956:	: :4,73I :	! :I,033! : !
MURASHIGE et SKOOG minéral	: :0,515: :	0,112	0,312	0,068	0,349	! :0,076! !
! ! CZAPECK !	: :0,43I: :	0,094	0,372	0,081	0,322	0,070!
HELLER	0,481	0,105	0,339	0,074	0,312	0,068

<u>Tableau I3</u>: Etude de la croissance de trois souches d'<u>Ustilago violacea</u> sur différents milieux de culture.

PF poids frais ; exprimés en g

Aucun des milieux minéraux (HELLER, CZAPECK, MURASHIGE et SKOOG minéral) n'est favorable à la croissance des souches. Le milieu de MURASHIGE et SKOOG complet et celui de LESCURE conviennent aussi bien que celui de SABOURAUD utilisé habituellement pour l'entretien des souches de champignons. Il faut cependant signaler que la morphologie des sporidies est très modifiée sur le milieu de SABOURAUD.

Les substances phytohormonales (2.4 D et Kinétine) contenues dans le milieu de MURASHIGE et SKOOG ont peu d'effet sur la croissance des souches. Du reste, ces substances ne sont pas indispensables pour le champignon qui pousse aussi bien sur le milieu de LESCURE dépourvu de ces phytohormones. Les vitamines autres que la vitamine $B_{\rm I}$, c'est-à-dire l'acide nicotinique, la pyridoxine et l'inositol, ne sont pas non plus indispensables.

Le milieu de LESCURE et celui de MURASHIGE et SKOOG étant tous les deux favorables (tableau I3), nous ne retiendrons pour la suite des travaux que le premier, pour sa simplicité, le second étant relativement complexe puisqu'il renferme des éléments minéraux et organiques ainsi que des facteurs hormonaux. La solution de SABOURAUD, bien que favorable au champignon (tableau I3) ne peut assurer la croissance des tissus isolés de silène (DUBOIS, I975) et, de ce fait, ne permet pas la culture simultanée de l'hôte et du parasite. Enfin, les trois souches d'<u>Ustilago violacea</u> prolifèrent de la même façon sur les différents milieux étudiés, car les quantités recueillies à la fin de l'expérience sont presque semblables pour les deux clônes compatibles, la souche de BAARN ayant une vitesse de croissance légèrement supérieure.

C - IMPORTANCE DE LA SOUPCE DE CARBONE.

Afin d'améliorer la croissance des souches, nous avons recherché parmi les oses, la source de carbone qui assurerait une meilleure culture. Ainsi, au milieu de LESCURE, nous avons ajouté différents sucres à raison de 30 g/l comme dans les milieux précédents. Deux cultures de I5 jours ont été réalisées, les résultats exprimés en gramme de matière fraîche sont réunis dans le tableau I4.

	: -		S	оисн	E S	
SUCRE	:	B.874	:	B.974	:	438-34
0	:	_	:	_	:	-
galactose	:	+	:	+	:	+
amidon	:	~	:	-	:	-
xylose	•	-	:	- ,	•	-
lactose	•	_	:	. dition	:	-
raffinose	•	-	:	- ,	:	-
arabinose	:	0,595	:	0,995	:	
tréhalose	:	4,681	:	3,726	:	5,225
maltose	•	3,785	:	3,708	:	6,738
mannitol	•	5,125	:	4,545	:	8,872
cellobiose	•	I,I27	:	I,370	:	-
glucose	:	3,448	:	3,253	:	3,945
saccharose	•	4,494	:	3,273	:	4,556
fructose	:	4,085	:	3,711	:	3,789

Tableau I4 : Culture de trois souches d'<u>Ustilago violacea</u>
sur milieu de LESCURE, avec différentes
sources de carbone. La valeur de la croissance
est exprimée en grammes.

Les sucres tels que le galactose, le xylose, le lactose, le raffinose, l'amidon, l'arabinose et le cellobiose sont extrêmement toxiques pour les trois souches d'<u>Ustilago violacea</u>. A l'exception du cellobiose, ils le sont aussi pour les suspensions cellulaires de <u>Silene alba</u>, hôte naturel d'<u>Ustilago violacea</u> (BRASSART et COLL., 1977). Le maltose et le mannitol favorables aux trois souches sont toxiques pour les cellules des silènes.

Parmi les diholosides, seuls le tréhalose et le saccharose, puis les hexoses tels que le glucose et le fructose, assurent une bonne croissance des souches sans être défavorables aux suspensions cellulaires des silènes. Nous avons alors retenu le saccharose qui est habituellement utilisé pour l'entretien des cultures de tissus isolés de Silene alba (DUBOIS, 1975).

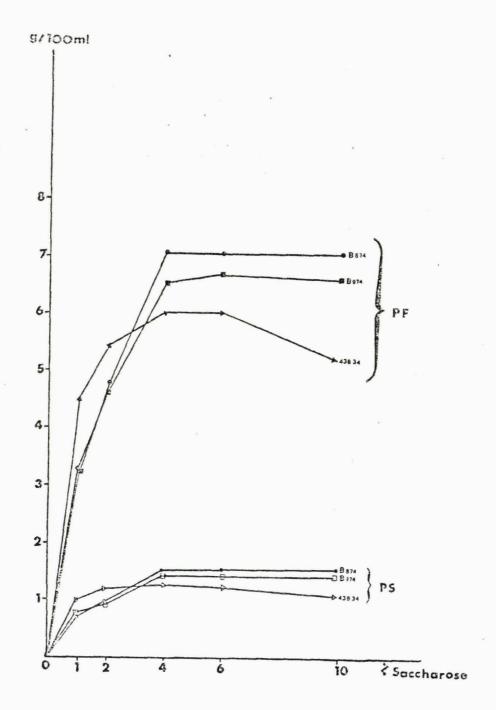


Fig. 3: Influence de la teneur en saccharose sur la croissance en milieu liquide agité de trois souches d'<u>Ustilago violacea</u>,

(BUS)

D - IMPORTANCE DE LA TENEUR EN SACCHAROSE.

De la même façon que précédemment, la croissance des souches a été étudiée dans le milieu de LESCURE, avec différentes concentrations de saccharose, afin de déterminer la meilleure dose.

Les doses de saccharose inférieures à I % assurent une faible croissance pour les trois souches, bien que la souche de BAARN (438-34) ait une croissance supérieure à celle des deux clônes compatibles. Cela signifie que la vitesse de croissance de cette souche de BAARN est plus grande à faibles doses de saccharose (fig. 3); cette vitesse baisse rapidement pour des concentrations supérieures à I %, puis s'arrête à 4 % où l'optimum de croissance est atteint.

Quant aux clônes B.874 et B.974, ils prolifèrent moins vite pour les faibles doses (inférieures à I %), mais la vitesse de croissance diminue moins vite pour les concentrations supérieures à I %, ce qui fait qu'à l'optimum (4 % de saccharose), leur croissance est plus importante que celle de la souche de BAARN (fig. 3).

En dehors d'une légère diminution observée à partir de 6 % pour cette dernière souche, aucune inhibition n'est à noter pour les clônes compatibles, même pour des quantités égales à IOO g de saccharose par litre de culture. Nous utiliserons, pour les cultures ultérieures, la dose moyenne de 30 g/1.

E - IMPORTANCE DE LA TENEUR EN VITAMINE BI.

Les travaux de SCHOPFER et BLUMER (1938) avaient déjà signalé l'importance de la vitamine B_{I} comme facteur de croissance des espèces du genre <u>Ustilago</u>. Au cours de travaux récents (BATCHO, 1976), nous avons montré que la présence de cette vitamine favorisait la croissance d'<u>Ustilago violacea</u>, même sur des milieux minéraux.

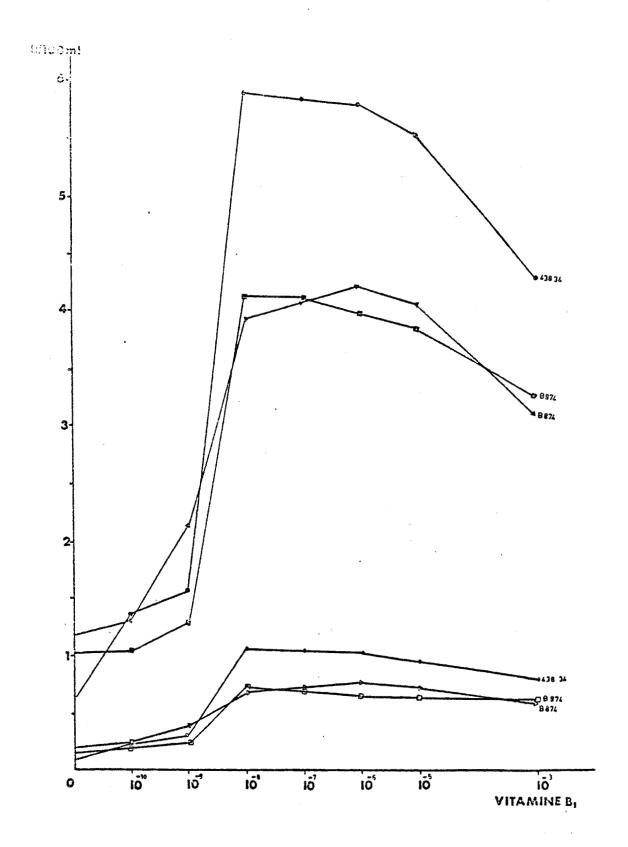




Fig.3 bis.Influence de la teneur en vitamine B_I sur la croissance en milieu liquide agité de trois souches d'Ustilago violacea.

Il est donc important de déterminer la dose qui assurerait la meilleure croissance des souches étudiées.

Différentes doses de vitamine B_I (sous forme de chlorhydrate de thiamine) sont ajoutées à la solution nutritive de LESCURE contenant 3 % de saccharose. Les observations faites après I5 jours de culture sont illustrées par la figure 3 b;s.

Comme pour la source de carbone, la vitamine B_I est indispensable au développement du champignon, puisque son absence empêche toute prolifération. Elle agit à très faible dose, mais la croissance est très faible pour les concentrations inférieures à IO⁻⁹ g/l. Au-dessus de cette dose, la croissance est très active jusqu'à IO⁻⁸, où l'optimum est atteint pour les trois souches. Cette fois, c'est plutôt la souche de BAARN (438-34) qui a la plus grande vitesse de croissance puisqu'elle est quantitativement plus importante à l'optimum de croissance. Les doses supérieures à IO⁻⁶ g/l réduisent cette croissance, et on observe une certaine toxicité pour les trois souches à partir de IO⁻³ g/l. Néanmoins, nous conservons pour l'entretien de ces clônes, la concentration de IO⁻⁶ g/l habituellement ajoutée au milieu de LESCURE.

CHAPITRE VI

INFLUENCE DE QUELQUES FACTEURS SUR LA CONJUGAISON DES SPORIDIES COMPATIBLES.

Après avoir défini le milieu d'entretien et les exigences des souches, nous avons étudié la conjugaison entre les sporidies compatibles.

Nous avons, d'une part, déterminé le taux de conjugaison (Cg. %) à partir d'un ou plusieurs comptages d'environ IOOO Cellules chacun :

Pour établir ce pourcentage, nous n'avons pas tenu compte des sporidies conjugant par 3 (comptées pour 2), ni des bourgeons encore attachés sur les sporidies végétatives.

D'autre part, les cultures clônales ne renferment que des sporidies isolées se multipliant par bourgeonnement.

Nous avons, grâce à leur homogénéité et à leur faible taille (4,3 x 3 µm) évaluer la croissance végétative des cultures par la mesure de la D.O.(densité optique). Celle-ci s'effectue à 550 nm, sur une partie aliquote des cultures diluée dix fois (dans certaines expériences, la lecture est effectuée sans dilution).

La croissance des microcultures mixtes a également été appréciée par la mesure de la D.O. après dilution au I/IOe. Il est évident qu'elle a une signification très différente de la croissance végétative mesurée sur les cultures clônales. Ces mesures sont toutefois nécessaires pour apprécier la viabilité des sporidies, en particulier, lorsqu'on les place dans un environnement leur étant défavorable.

A - CINETIQUE DE LA CONJUGAISON.

A partir de sporidies (clônes B.874 et B.974) cultivées séparément pendant 48 heures en milieu liquide agité, on réalise une série de microcultures mixtes. Pour cela, on mélange 0,5 ml de chacune des suspensions clônales dans une microcuvette recouverte d'une lame de verre et placée dans une boîte de Pétri. Ces boîtes sont mises à l'obscurité à 20 + I°C.

La conjugaison se déroule en trois temps :

- Stade I = Appariement : deux sporidies de signe contraire se rapprochent et se déplacent ensemble dans le milieu liquide, sans toutefois qu'il y ait de contact entre-elles. Les premiers appariements se produisent en deux heures.
- Stade 2 = Accolement : après trois heures de culture mixte, les sporidies s'accolent par paires, sans qu'on puisse distinguer si elles sont réellement soudées.
 Des observations en microscopie électronique (CUMMINS et DAY, 1974) ont montré qu'à ce stade, les parois sont soudées, alors que les plasmalemmes sont encore séparés.
- Stade 3 = Développement du tube de conjugaison : après 5 heures, les premiers tubes de conjugaison apparaissent entre les sporidies accolées ; ils s'allongent dans les heures qui suivent pour atteindre une taille égale à celle des sporidies (4 à 5 µm).

Le pourcentage de conjugaison a été déterminé en tenant compte des couples de sporidies ayant formé un tube de conjugaison (Stade 3 - PL.I - fig. I). Il a été évalué pendant 72 heures de culture, d'abord toutes les heures, puis à intervalles plus espacés (tableau I5). Ce pourcentage est nul pendant les 4 premières heures, puis augmente rapidement entre la 5ème et la I2ème heure de culture; le taux maximum est atteint 24 heures après la mise en place des microcultures.

Nous avons également observé que les sporidies conjuguent aussi lorsqu'on les dépose en mélange à la surface du milieu nutritif solidifié par de l'agar (8 %). POON MARTIN et DAY (1974), qui utilisent de l'eau gélosée comme milieu de conjugaison, obtiennent les premiers tubes (2 h à 2 h 30 après avoir mélangé les clônes compatibles). Néanmoins, après I2 ou 24 heures de culture en milieu liquide, les taux de conjugaison que nous obtenons sont supérieurs à ceux qu'ils dénombrent sur de l'eau gélosée (respectivement 70,9 et 87,2 % pour environ 50 à 70 %).

En même temps, la prolifération des cellules a été évaluée en mesurant la D.O. des microcultures diluées IO fois. Elle est rapide entre la 2ème et la 5ème heure. Dès qu'un grand nombre de sporidies sont accolées, elle est ralentie, sans doute parce que seules les cellules végétatives bourgeonnent activement. D'ailleurs, dans des cultures en gouttes pendantes, lorsque les sporidies sont trop éloignées les unes des autres, on observe après 5 ou 6 jours, de nombreuses petites colonies végétatives bien séparées et provenant du bourgeonnement des sporidies isolées. Par contre, dans les cultures riches en sporidies, où les conjugaisons sont nombreuses, ces colonies végétatives sont presque inexistantes.

On comprend donc que la croissance se ralentisse dès que le taux de conjugaison augmente. Après 24 heures, il ne reste dans les microcultures qu'environ IO à I5 % de sporidies non conjuguées ; la croissance est alors très faible.

B - VARIATION DE L'APTITUDE A CONJUGUER AU COURS DE LA CROISSANCE.

Des flacons renfermant chacun 200 ml de milieu nutritif sont ensemencés à la densité de 3.10^6 cellules/ml avec les clônes B.874 et B.974 provenant d'une culture âgée de 7 jours, puis placés à $20 \pm 1^\circ \text{C}$ sur un agitateur rotatif. Toutes les 24 heures, on mesure la croissance et on prépare des microcultures mixtes que l'on place à l'obscurité à $20 \pm 1^\circ \text{C}$. Le taux de conjugaison déterminé 24 heures plus tard

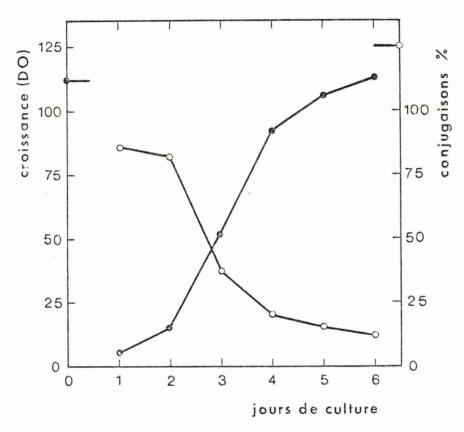


Fig. 4 – Croissance d'une culture clonale de l'U. v. en milieu liquide agité (--) et variations de l'aptitude à conjuguer (-0-). La croissance est évaluée par la mesure de la D. O. après dilution au 1/10e; l'aptitude à conjuguer par le taux de conjugaison, 24 h après avoir mélangé les clones compatibles.



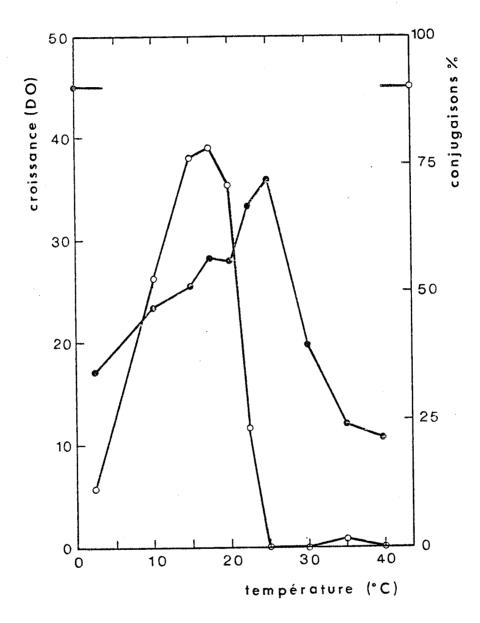
! TEMPS (h)	:	CONJUGAISON (%)	:	CROISSANCE (D.O.) !
! 0	:	0 + 0	:	!!
į I	:	o <u>+</u> o	:	II,5 <u>+</u> 0,5
1 2		0,I <u>+</u> 0,I	:	I2,0 <u>+</u> I,0
1 3	:	0,I <u>+</u> 0,I	:	13,5 <u>+</u> 0,5
! 4	:	o <u>+</u> o	:	I5,5 + 0,5
5	•	6,3 <u>+</u> 5,1	:	17,0 <u>+</u> 0,5
	:	27,8 <u>+</u> 17,8	:	17,0 <u>+</u> 0,5
9	:	58,6 <u>+</u> 12,1	:	18,5 <u>+</u> 1,5 !
! I2	:	70,9 <u>+</u> 9,0	:	20,5 <u>+</u> I,5 !
! 24	:	87,2 <u>+</u> 3,8	:	29,0 <u>+</u> 5,0 !
! 48	:	81,8 <u>+</u> 3,2	:	32,5 <u>+</u> 3,5 !
. 72	:	80,3 <u>+</u> 8,0	:	36,0 <u>+</u> 4,0 !

Tableau I5: Evolution du pourcentage de conjugaison et croissance d'une microculture mixte (clônes B 874 et B.974) d'Ustilago violacea, à l'obscurité et à la température de 20 + I°C

et les mesures de la croissance, effectuées à partir des cultures clônales, sont rapportés sur la figure 4.

La croissance des sporidies est rapide jusqu'au 4ème jour, puis beaucoup plus lente. A partir du 7ème jour, on observe un plateau correspondant à une phase stationnaire pouvant se prolonger pendant une semaine.

L'aptitude à la conjugaison, qui est très élevée dans les cultures les plus jeunes, diminue entre le 2ème et le 3ème jour, puis plus lentement par la suite. Au cours de la phase stationnaire, les sporidies sont pratiquement incapables de conjuguer. La diminution très rapide de leur aptitude à



Fig, 5 — Variation de la croissance (--) et du taux de conjugaison (-o-) des microcultures mixtes de l'U. v. en fonction de la température. Les mesures de la D. O. et du taux de conjugaison sont effectuées 24 h après l'ensemencement.



conjuguer semble liée à trois facteurs au moins :

- l'âge des sporidies;
- la densité des cultures;
- la composition du milieu nutritif.

Il est évident que la croissance végétative s'accompagne de la consommation d'un certain nombre d'éléments qui peut entraîner des déséquilibres ioniques, une modification du pH et même des carences.

Par ailleurs, en vieillissant, les cellules rejettent dans le milieu des substances diverses, dont certaines pourraient favoriser ou inhiber la conjugaison. Avant d'analyser l'action propre de chacun de ces facteurs, nous déterminerons les effets de la température et de la lumière qui jouent un rôle important sur la sexualité des champignons (BECERESCU, 1973; KRAJNY, 1974; HUGUENIN, 1974; DEHORTER, 1972), mais dont les effets sur la conjugaison d'Ustilago violacea sont peu connus.

C - FACTEURS PHYSIQUES CONTROLANT LA CONJUGAISON.

a) Température :

Des sporidies âgées de 48 heures (clônes B.874 et B.974) sont séparées de leur milieu de culture par centrifugation (I5 mn à 9000 g), rincées à l'eau distillée et remises en suspension à la concentration de 22.IO cellules/ml dans du milieu neuf. On mélange alors à volume égal les deux clônes compatibles et on introduit I ml de ce mélange dans une série de microcuvettes, elles-mêmes placées dans des boîtes de Pétri. Ces dernières sont placées à l'obscurité dans des enceintes dont les températures s'échelonnent entre 2,5 et 40°C.

Après 24 heures de traitement, on constate que les températures stimulant le bourgeonnement ne sont pas les mêmes que celles qui favorisent la conjugaison (fig. 5). A 2,5°C, le taux de conjugaison est très variable mais toujours faible; le bourgeonnement est très faible également. Les températures les

plus favorables à la conjugaison sont comprises entre 15 et 20°C (optimum à 17,5°C). Au-dessus de 20°C, le taux de conjugaison diminue très rapidement, il est pratiquement nul à partir de 25°C. La croissance des sporidies est stimulée par les températures moyennement élevées. Celle de 25°C, pour laquelle la croissance est optimale, provoque des modifications de la morphogenèse. Après 48 heures, on observe dans des microcultures de nombreuses chaînettes linéaires ou ramifiées formées de 3 à 8 cellules accolées (PL.I - fig. 5). Après 4 jours, ces "chaînettes" commencent à se dissocier et un certain nombre de cellules commencent à s'engager sur la voie de la reproduction sexuée. A partir du 5ème ou du 6ème jour, les accolements sont nombreux et on observe des conjugaisons dont le pourcentage varie selon les cultures, mais qui se caractérisent le plus souvent par un tube de conjugaison relativement court (PL.I - fig. I).

Les températures de 25 à 30°C n'inhibent donc pas la conjugaison : elles en ralentissent considérablement les processus. On comprend que dans ces conditions, après 24 heures de culture, le bourgeonnement soit beaucoup plus important. A 35°C, les cellules ne se divisent plus et meurent très rapidement.

Des cultures placées à 25 et même à 30°C pendant 24 heures, puis remises à la température de I7,5°C, présentent 24 heures plus tard, des taux de conjugaison élevés. De même, des sporidies laissées 24 heures à 2,5°C et remises à I7,5 ou à 20°C conjuguent tout à fait normalement 24 heures après leur transfert.

b) Lumière:

Pour déterminer l'influence de la lumière sur le déroulement de la conjugaison, nous avons préparé une série de microcultures mixtes analogues à celles utilisées pour analyser les effets de la température. Une partie des cultures est placée à l'obscurité à 20 ± 1°C, l'autre reçoit en plus de la lumière du jour, un éclairement continu d'environ IOOO lux fourni par des tubes luminescents (type lumière de jour de luxe). Le taux de conjugaison et la croissance, après 24 heures de traitement, sont

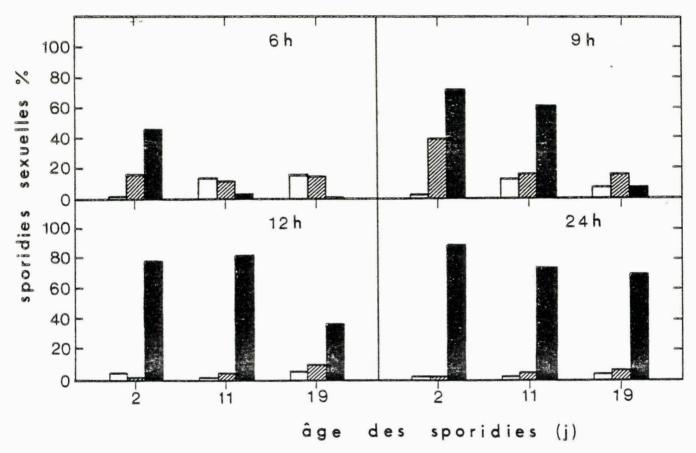


Fig. 6 – Histogramme montrant l'effet de l'âge des sporidies de l'U. v. sur la cinétique de la conjugaison. Les pourcentages de cellules appariées (en blanc), accolées (en hachures) et présentant un tube de conjugaison (en noir) sont mesurées après 6, 9, 12 et 24 h de culture.

les mêmes à la lumière qu'à l'obscurité (tableau I6).

: FACTEURS PHYSIOUES :	CONJUGAISON :	CROISSANCE (D.O.)
: Lumière :	60,8 + 2,6 :	27,0 <u>+</u> 2,0
Obscurité :	6I,5 <u>+</u> 2,2 :	$28,0 \pm 3,5$

<u>Tableau I6</u>: Effet de la lumière sur la conjugaison et la croissance des sporidies d'<u>Ustilago</u> violacea.

D - FACTEURS PHYSIOLOGIQUES.

a) Age des sporidies :

Pour étudier les effets de l'âge des sporidies, nous ensemençons trois séries de microcultures avec des cellules provenant de la culture des clônes B.874 et B.974 âgés de 2, II et I9 jours. Les cultures mixtes sont préparées dans les mêmes conditions que pour les expériences précédentes, à la densité initiale de 22.I0 cellules/ml. Elles sont placées à l'obscurité à la température optimale de I7,5°C.

6, 9, 12 et 24 heures après la mise en place des microcultures, on détermine le pourcentage des cellules parvenues aux différents stades de conjugaison précédemment définis.

L'âge des sporidies modifie la dynamique de la conjugaison (fig. 6). Après 6 heures, seules les sporidies les plus jeunes parviennent au 3ème stade (45,6 % des cellules de deux jours). Après 9 heures, 69,8 % des sporidies âgées de II jours y parviennent également, alors que la plupart de celles prélevées à I9 jours sont encore au stade 2. En 24 heures, 68,3 % des sporidies les plus âgées sont à leur tour au stade 3. La conjugaison se déroule donc d'autant plus lentement que les cellules mises en contact sont plus âgées, mais après 24 heures, les pourcentages de conjugaison (stade 3) diffèrent peu.

Ils sont toutefois un peu plus faibles lorsque les cellules ont plus de II jours.

L'âge des sporidies ne modifie pas la croissance (tableau I7).

! DUREE! DE LA		AGE DES SPORIDIES ENSEMENCEES						
CULTURE (h)	micro	cultures	mixtes	cul	tures cl	ônales !		
!	2 j.	illj.	I9 j.	2 j.	12 j.	22 j. !		
! 0	12	: II	13	0.5	06	05,5		
! 6	15	: I4	15,5	. 08,5	09	: 08,5 !		
9	16	: 14,5		10,5	10,5	10 !		
! 12	I7	: 16,5	: 18	: 13	I 2	: II :		
24	23	22	24	2.9	22	. I9 !		
! 48	_	•	· •	: 40	80	: 69 !		
46	-	: -	-	125	122,5	125 !		
! :		:	•	•	•	: !		

Tableau I7 : Effet de l'âge des sporidies sur la croissance (mesurée par la D.O.) de microcultures mixtes et de cultures clônales d'Ustilago violacea.

En particulier, on ne constate pas d'augmentation de la phase de latence comme c'est le cas pour des cellules isolées de nombreuses plantes supérieures (DUBOIS, I975). Dans les microcultures, la croissance n'est pas indépendante des phénomènes sexuels puisque le ralentissement de la conjugaison, lorsque les cellules sont âgées, semble favoriser le bourgeonnement. Dans les cultures clônales, en milieu liquide agité, où il n'y a pas conjugaison, l'âge des cellules ne modifie pas la croissance tout au moins lorsqu'elles ont moins de II jours au moment de l'ensemencement. Des cellules plus âgées présentent cependant une courte phase de latence avant de commencer à bourgeonner.

b) Densité des cultures :

Des sporidies âgées de 7 jours, provenant des clônes B.874 et B.974, sont séparées de la solution nutritive, rincées et introduites dans du milieu neuf; à partir de ces suspensions, nous réalisons des microcultures mixtes à des concentrations variant de 6.10^5 à 6.10^8 cellules/ml. Ces microcultures sont placées pendant 24 heures dans une enceinte obscure dont la température est maintenue à $20 + 1^{\circ}$ C.

Les pourcentages de conjugaison les plus élevés sont obtenus quand on dilue IOO ou 200 fois les suspensions, ce qui correspond à une densité cellulaire comprise entre 6.10 cellules/ml et 3.10 cellules/ml. Une densité cellulaire IOO fois plus élevée ou IO fois plus faible réduit fortement le taux de conjugaison. Un trop grand nombre de cellules doit gêner la rencontre des cellules compatibles; de plus, si l'inhibition est liée à une modification du milieu, celle-ci sera d'autant plus importante que la densité des sporidies est élevée. Inversement, lorsque la densité des cellules est très faible, la réduction du taux de conjugaison résulte sans doute de la difficulté qu'ont les sporidies à rencontrer un partenaire compatible (tableau I8).

! : !Densité des: ! sporidies :	6.108	6.10 ⁷	3.10 ⁷	6.10 ⁶	3.10 ⁶	6.IO ⁵ !
! de conju-: I ! gaison : !	,6 <u>+</u> 0,4	50,4 <u>+</u> 4,8	57,0 <u>+</u> 2,9	66,6 <u>+</u> 5,3	65,4 <u>+</u> 9,3	9,5 <u>+</u> 2,6

<u>Tableau I8</u>: Effet de la densité cellulaire sur le pourcentage de conjugaison.

E - IMPORTANCE DU CARBONE ET DE L'AZOTE,

L'équilibre entre ces deux substances joue souvent un rôle prépondérant sur la croissance et la reproduction sexuée des champignons. On sait même depuis longtemps que des milieux pauvres favorisent la conjugaison de nombreuses espèces d'<u>Ustilago</u>, dont <u>U.Violacea</u> (KNIEP, 1919; BAUCH, 1922). Notre milieu d'entretien renferme des nitrates (I,96 g/l de ${
m NO}_3{
m K}$ et 0,29 g/l de ${({
m NO}_3)}_2{
m Ca}$, 4 H₂0) et du saccharose (20 g/l). Pour ces expériences, nous avons simplement multiplié les doses de ${
m NO}_3{
m K}$ et de saccharose par 0, 0,5, I, 2 et 4. Dans ces conditions, les milieux testés renferment respectivement 35, I70, 305, 580 et II20 mg/l d'azote et 0, I0, 20, 40 et 80 g/l de saccharose.

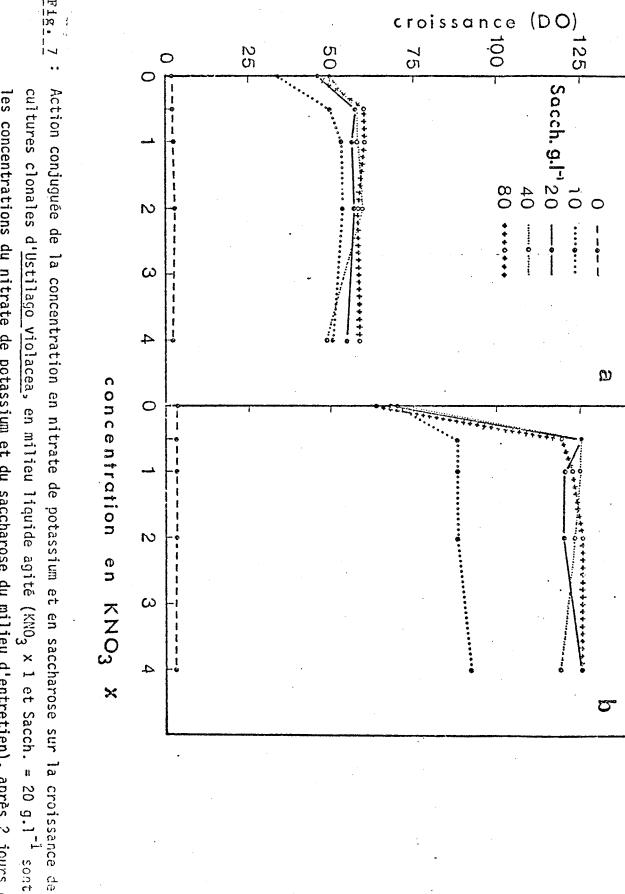
Dans une première expérience (tableau I9), les sporidies sont cultivées séparément pendant 48 heures sur le milieu d'entretien, puis recueillies par centrifugation, rincées à l'eau distillée et ensemencées en mélange dans des microcultures renfermant des doses variables de carbone et d'azote.

!!	AZOTE	:		SAC	CHAROSE	(g/1)		
!	(mg/1)	:	0	10	20	: 40	:	80
!	35	:	73,6	: : 67,0	: : 79,I	: : 66,0	:	54,I
!	170	:	67,5	84,6	82,9	76,9	:	64,5
!	305	:	67,3	: 79,6	: 68,8	: 68,0	:	57,3
!	580	:	52,8	68,9	71,7	66,8	:	46,7
!	1120	:	41,5	: 40,5	: 43,8	: 35,9	:	0,2
!		:		:	:		:	

Tableau 19: Effet de la concentration du saccharose et du nitrate de potassium sur le taux de conjugaison des sporidies.

Les cultures, dont la densité cellulaire a été ajustée à 15.10 cellules/ml, sont placées 24 heures à l'obscurité à 17,5°C. Les sporidies conjuguent même en l'absence de sucre. Des doses de 10 et de 20 g/l stimulent la conjugaison ; des doses plus élevées, sont inhibitrices. Une augmentation de la teneur en azote entre 35 et II20 mg/l est d'abord favorable (jusqu'à 170 mg/l), puis de plus en plus défavorable.

Les milieux les plus concentrés en azote réduisent le taux de conjugaison d'environ 50 % et lorsque la teneur en saccharose est elle-même élevée (80 g/l), l'inhibition est presque totale (taux de conjugaison : 0,2 %).



ರ

et 4 jours (b). cultures clonales d'<u>Ustilago violacea</u>, en milieu liquide agité (KNO3 x 1 et Sacch. = 20 g.l⁻¹ sont les concentrations du nitrate de potassium et du saccharose du milieu d'entretien), après 2 jours (a)

Dans une seconde expérience (tableau 20), les deux clônes sont d'abord cultivés séparément pendant 6 jours sur

!	AZOTE	:	, , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,	SAC	SACCHAROSE (g/1)				
1	(mg/1)	:	0	10	20	40	80		
!	35	:	73,5	75,9	82,8	68,2	78,7		
İ	170	:	78,I	: 84,8	86,9	81,9	77,3		
!	305	:	69,I	67,2	75,3	76,4	. 60,I		
!	580	:	67,3	57,7	68,0	53,8	· : 1,3		
!	II20	:	55,7	49,6	60,6	6,8	. 0,2		
<u>i</u>		:		•	•		•		

<u>Tableau 20</u>: Effet de la concentration du saccharose et du nitrate de potassium sur la conjugaison des clônes B.874 et B.974 préalablement cultivés séparément pendant 6 jours sur les milieux à tester.

les différents milieux à tester. Une partie aliquote de chacune des cultures est alors diluée avec du milieu neuf présentant les mêmes proportions de carbone et d'azote, de manière à ramener la densité cellulaire à I5.10 cellules/ml et les deux suspensions compatibles sont mélangées. Des microcultures renfermant I ml de mélange sont placées dans les mêmes conditions que lors de l'expérience précédente.

Les résultats diffèrent peu des précédents. Notons toutefois que les fortes teneurs en saccharose sont mieux tolérées quand les concentrations d'azote sont favorables, mais que l'inhibition de la conjugaison est encore plus marquée quand les milieux sont trop riches en azote.

Les effets de la teneur en carbone et en azote sur la croissance végétative ont été déterminés sur des parties aliquotes des cultures clônales après 2 et 4 jours de culture (fig. 7). Les milieux dépourvus de sucre empêchent le bourgeonnement. La croissance est optimale avec 20 g/l de saccharose; elle n'est pas réduite par des doses supérieures (jusqu'à 80 g/l).

L'azote favorise également la croissance végétative jusqu'à environ 200 mg/l, mais des doses supérieures ne la réduisent pas non plus.

Le rapport carbone/azote qui contrôle la sexualisation de nombreux champígnons (HALL, I979; DEHORTER, I972) n'intervient pas sur la conjugaison d'<u>Ustilago violacea</u>, que ce soit pendant la culture mixte ou pendant la culture clônale précédent le mélange des sporidies compatibles, mais les teneurs en carbone et en azote ne doivent pas dépasser respectivement 20 g/l et 200 mg/l. On remarque que les doses qui favorisent la croissance végétative et la conjugaison sont les mêmes.

Les résultats obtenus jusqu'ici montrent que la réduction de l'aptitude à conjuguer qui se manifeste dans les cultures clônales entretenues en milieu liquide agité (fig. 4) ne peut s'expliquer ni par le vieillissement des cellules (fig. 6), ni par l'augmentation de la densité cellulaire (tableau I8), ni par une diminution - même importante - de l'azote ou du carbone (tableaux I9 et 20).

F - EFFET DU FILTRAT DE CULTURE SUR LA CONJUGAISON DES SPORIDIES.

Nous avons réalisé une série de microcultures mixtes sur du milieu de LESCURE neuf, sur un filtrat provenant d'une culture clônale de IO jours et sur de l'eau distillée, dans les conditions favorables suivantes : température de 20 ± 1°C, obscurité, densité cellulaire d'environ I.IO⁻⁷ cellules/ml. L'expérience effectuée avec des sporidies âgées de 48 h et de IO jours montre que le filtrat inhibe totalement la conjugaison, alors que l'eau distillée et le milieu de LESCURE neuf fournissent des taux de conjugaison très élevés (tableau 2I). Des vérifications effectuées après 48 h et 3 jours montrent qu'il s'agit bien d'une inhibition et pas d'un simple retard. L'origine des substances mises en cause peut être double : secrétion des sporidies ou rejet de substances dans le milieu dû à la lyse de cellules âgées. Dans les deux cas, il est normal que la

concentration des produits augmente au fur et à mesure du vieillissement des cultures, et donc que l'aptitude à conjuguer des sporidies diminue progressivement : c'est bien ce que l'on constate sur la fig. 4.

MILIEU DE CULTURE	TAUX DE CO	ONJUGAISON !
!	Exp. I	Exp. 2
! LESCURE neuf	: 75,7	80,7
! Filtrat de IO jours	0	0
! Eau distillée !	82,2	78,I !

Tableau 2I : Mise en évidence de facteurs inhibiteurs de la conjugaison dans un filtrat (milieu dans lequel les sporidies se sont multipliées pendant IO jours). L'ensemencement des microcultures est effectué avec des sporidies de 48 heures (Exp. I) ou de IO jours (Exp. 2)

Enfin, des produits secrétés par les sporidies au cours de culture, ou rejetés dans le milieu lors de la lyse, peuvent modifier le pH, et cette modification joue un rôle plus ou moins important selon les espèces de champignon (HUGUENIN, I974).

G - VARIATIONS DU PH ET DE L'APTITUDE A CONJUGUER DES SPORIDIES AU COURS DU CYCLE DE CROISSANCE DES CULTURES CLONALES.

Dans les conditions expérimentales utilisées, il n'y a pas de phase de latence. La prolifération des sporidies est exponentielle pendant les 4 premiers jours de culture ; elle se ralentit du 4ème au 7ème jour, puis les cultures entrent dans une phase stationnaire qui dure plus d'une semaine. Le pH du milieu augmente rapidement pendant la période de croissance active, passant de $5,6\pm0,I$ à $7,8\pm0,I$ en sept jours ; il augmente ensuite plus lentement, atteignant $8,3\pm0,2$ entre

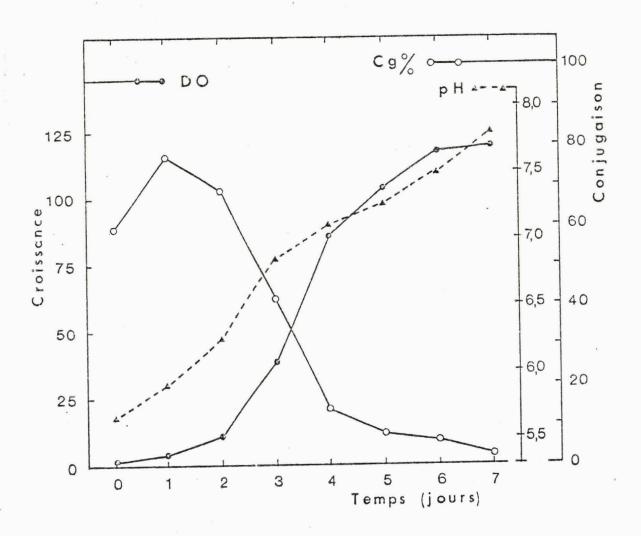


Fig. 8 : Croissance d'une culture clônale d'<u>Ustilago violacea</u>, évolution du pH du milieu et de l'aptitude à la conjugaison des sporidies, au cours des sept premiers jours de culture.



le douzième et le quinzième jour.

Pour déterminer l'aptitude à conjuguer des sporidies, on prélève chaque jour des fractions de 0,5 ml dans les cultures clônales, et on détermine les taux de conjugaison 24 heures après avoir mélangé les fractions renfermant les cellules compatibles. L'aptitude à la conjugaison (fig. 8) augmente faiblement au cours de la première journée, puis diminue, d'abord lentement, puis plus rapidement à partir du troisième jour. Quatre jours après l'ensemencement des cultures clônales, le taux de conjugaison est de I3 % seulement, soit six fois plus faible que le taux maximal.

L'aptitude à la conjugaison est donc la plus élevée quand le pH du milieu est de l'ordre de 5,9 ; elle est environ deux fois plus faible quand le pH est égal à 7, et elle est presque nulle lorsqu'il est supérieur à 7,5.

H - VARIATIONS DU TAUX DE CONJUGAISON EN FONCTION DU PH DU MILIEU DES MICROCULTURES MIXTES.

Les variations du taux de conjugaison ont été suivies dans quatre milieux différents : eau distillée, milieu d'entretien et milieu d'entretien tamponné par du Tris HCl et par du tampon phosphate Sörensen.

Dans les milieux non tamponnés, les taux obtenus sont élevés, mais le pH varie pendant la durée de la culture. Les résultats sont donc différents, selon que l'on considère le pH initial ou le pH final, mesuré au moment du dénombrement des conjugaisons (tableau 22). Les pH initiaux les plus favorables sont compris entre 6 et II pour l'eau distillée et entre 5 et 8 pour le milieu d'entretien non tamponné. Si on se réfère au pH final, la zone favorable est plus étroite : de 7 à 8 dans l'eau distillée et de 6,6 à 7,8 dans le milieu d'entretien.

En général, dans les milieux tamponnés, les taux de conjugaison sont nettement plus faibles. Utilisé à faible concentration (0,05 M), le tampon Tris HCl n'empêche pas les variations du pH. Aux concentrations supérieures, il devient rapidement toxique, surtout en milieu neutre ou basique. Le tampon phosphate, à la concentration finale de 0,I M est moins toxique, tout en limitant aussi efficacement les variations de pH. Dans ce milieu, le taux de conjugaison est maximum à pH 5,5; il diminue faiblement entre 5,5 et 6,0 et fortement entre 6,0 et 7,0.

En considérant l'ensemble des résultats (tableau 22), on constate que :

- les pH inférieurs à 5 sont fortement inhibiteurs,
- les pH compris entre 5 et 6 sont les plus favorables,
- entre 6 et 8, les effets du pH varient selon le milieu utilisé, et la concentration du tampon,
- au-dessus de 8, les conjugaisons sont totalement inhibées, sauf dans l'eau.

- MISE EN EVIDENCE D'UN FACTEUR INHIBITEUR DE LA CONJUGAISON DANS LE FILTRAT DES CULTURES CLONALES EN PHASE STATIONNAIRE.

Des sporidies compatibles placées dans les conditions les plus favorables à la conjugaison, ne manifestent pas d'activité sexuelle lorsque le milieu liquide (eau distillée ou milieu d'entretien) est remplacé par du filtrat prélevé dans une culture clônale d'<u>Ustilago violacea</u> âgé de IO à I4 jours. Le blocage de la conjugaison peut être dû, comme nous le suggérions précédemment, à la présence de substances inhibitrices dans le filtrat et au pH du filtrat, qui est voisin de 8 pendant la phase stationnaire.

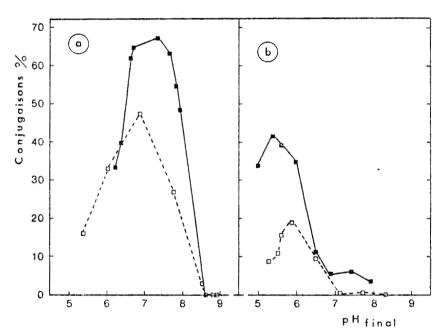
1								
1	Milie	ux nor	tampo	nnés	Mi		d'entre ponnés	etien
! pH	: <u>-</u> Ea		Mil		Tri	s HC1		ensen
initial	disti	llée	d'entr	etien	0	,I M	0	IM
!	pHf	% Cg	pHf	% Cg	рĦf	% Cg	pHf	% Cg
! 3,2	: : 4,2 :	15,5	6,2	33,4:	-	: -	-	: - !
! 4,0	: 7,0 :	29,2	6,4:	40,2:	-	: : -	: -	: - !
! 4,5	: - :	- :	- :	- :		-	5,0	34,1
! 5,0	: 7,I :	41,4	6,6	61,8:	6,4	32,3	5,4	41,4 !
1 5,5	: - : : - :	-	- :	- :	-	-	5,6	39,2
1 6,0	6,9	75,2	6,7	64,8:	6,8	17,8	6,0	35,I !
1 7,0	7,4 :	76,I	7,3:	67,5:	7,2	6,6	6,9	5,5
! 8,0	7,4:	78,4	7,6:	66,I:	8,0	0,0	7,9	3,4!
9,0	: 7,8 :	76,2 :	7,8:	54,5:	8,8	0,0	: - : :	: - !
! IO,0 !	· 7,9 ·	76,3	7,9:	48,5: :	9,0	0,0	: - : :	: - ! : !
! II,0 !	: 8,I : : :	74,6 :	8,5:	0,0:	_	<u>-</u>	- :	- ! - !

Tableau 22 : Variation du taux de conjugaison, en fonction du pH initial du milieu.

Le taux de conjugaison (Cg %) et le pH final (pHf) du milieu sont déterminés 48 h après l'ensemencement des microcultures mixtes.

Pour déterminer la cause exacte de l'inhibition de la conjugaison, nous avons comparé les taux de conjugaison obtenus à différents pH dans un milieu d'entretien et dans le filtrat d'une culture clônale âgée de I2 jours. Les résultats montrent que le pH varie plus ou moins selon le milieu utilisé.





Ou'ils soient exprimés par rapport au pH initial (tableau 23) ou par rapport au pH final (fig. 9), les taux de conjugaison sont toujours plus faibles avec les filtrats qu'avec les milieux neufs de même pH. Entre 5 et 6 (pH initiaux), la réduction du taux de conjugaison est d'environ 40 % en milieu non tamponné et d'environ 60 % en présence du tampon phosphate 0,I M.

L'inhibition de la conjugaison provoquée par le filtrat des cultures clônales n'est pas due uniquement au pH alcalin. Elle est également provoquée par des substances rejetées dans le milieu par les sporidies végétatives ou libérées à la suite de la lyse d'une partie des cellules.

!	Milieux non t	amponnés :	Milieux	tamponnés !
! pH		filtrat :	LESCURE	filtrat!
initial		une cul- :	modifié	d'une cul-!
! Initial		re clônale		ture clônale!
!	·	<u>de I2 j. :</u>		: de I2 j.!
!	pHf % Cg p	Hf % Cg	pHf % Cg	pHf % Cg
!	: ; ; ; ;	: :	:	: : !
! 3,0	6,2:33,4:5	,3:16,7:	- : -	- : - !
4,0	6,4 40,2 6	,0 32,9		
4,5	- : - :	- : - :	5,0:34,1	5,3 : 8,9 !
5,0	6,6 61,8 6	,9 48,5	5,4 41,4	5,5 10,9
! 5,5	: - : - :	- : - :	5,6:39,2	: 5,6 : 16,0 !
6,0	6,7 64,8 7	,7 27,2	6,0 35,1	5,9 18,8
1 6,5	: - : - : 8	,5 : 3,I :	6,5 : II,2	: 6,5 : 9,7 !
7,0	7,3 67,5 8	,6 0,0	6,9 5,5	7,1 0,2
! 7,5	- : - :	- : - :	7,4: 5,9	: 7,7 : 0,3 !
8,0	7,6 66,1 8	,8 0,0	7,9 3,4	8,3 0,0
9,0	: 7,8 : 54,5: 8	,9:0,0:	- : -	: - : - !
! 10,0	7,9 48,5 9	,2 0,0	_ : -	: - : - !
! 11,0	8,5 : 0,0: 9	,3:0,0:	- : -	: - : - !
!	<u> </u>	<u>: :</u>	<u> </u>	<u>: </u>

<u>Tableau 23</u>: Comparaison des taux de conjugaison à différents pH, dans du milieu d'entretien et dans du filtrat prélevé dans une culture clônale âgée de I2 jours, tamponnés ou non.

Le taux de conjugaison (Cg %) et le pH final (pHf) sont déterminés 48 h après l'ensemencement des micro-cultures mixtes.

J - ESSAIS DE CULTURE IN VITRO DE FILAMENTS DICARYOTIQUES.

a) Observation de filaments dans des cultures axéniques :

On sait que, dans la nature, les sporidies conjuguées donnent naissance à des filaments dicaryotiques qui pénétrent dans les tissus de la plante-hôte. <u>In vitro</u>, ces filaments sont rarement observés chez <u>Ustilago violacea</u> (DAY et JONES, 1968).

Dans les microcultures destinées à dénombrer les conjugaisons, nous observons de temps en temps des filaments dicaryotiques issus de la conjugaison de deux sporidies.

Le plus souvent, le filament mycélien se développe à partir de l'une des deux sporidies (PL.I - fig. 8) et très rapidement, l'autre sporidie se vide de son contenu cytoplasmique (PL.I - fig. I2). Quelquefois, le filament se forme à partir du tube de conjugaison (PL.I - fig. 9). Quelles que soient leurs origines, ils ont une croissance limitée, dépassant rarement 25 µm et ne se ramifient pas. Beaucoup plus rarement encore, nous observons des filaments émettant des sporidies, soit à leur base (PL.I - fig. II), soit à leur extrémité (PL.I - fig. IO). Ces filaments, bourgeonnant sont ceux que l'on observe le plus fréquemment. Ils marquent un retour vers un stade levuroïde, haploïde ou diploïde. Mais il n'est pas impossible que ces figures correspondent à des conjugaisons anormales entre un filament présumé dicaryotique et une sporidie haploïde. En effet, les conjugaisons entre partenaires multiples (le plus souvent 3) ne sont pas rares (PL.I _ fig. 2, 3, 4), et nous avons déjà signalé que des conjugaisons pouvaient s'effectuer entre des éléments très variés.

Dans les microcultures, le pourcentage de conjugaisons produisant un filament est toujours très faible : moins de un sur 10⁴ Pour pouvoir faire des observations pendant une période relativement longue, sur une même population de sporidies conjuguées, nous avons adopté une technique de culture en goutte pendante.

Bien que les sporidies restent vivantes pendant une quinzaine de jours, les filaments ne sont pas plus nombreux et leur croissance s'arrête dès qu'ils mesurent 30 à 35 μm .

b) Recherches en vue de cultiver le mycélium dicaryotique :

Nous avons réalisé une culture associée de sporidies compatibles et de colonies tissulaires de <u>Silene alba</u>. Les sporidies non conjuguées présentes dans la goutte de suspension déposée sur le tissu, se multiplient très rapidement et recouvrent en quelques jours la surface du milieu gélosé, rendant les observations d'éventuels filaments mycéliens très difficiles.

La culture associée de sporidies (souche B) et de cellules relativement isolées de Silène provenant de cultures entretenues en milieu liquide agité (DUBOIS et BOURIQUET, I974) est plus fructueuse. Les essais ont été conduits en goutte pendante avec du milieu de LESCURE conditionné (les cellules isolées de Silène y ont séjourné pendant IO jours). Les sporidies demeurent vivantes pendant une quinzaine de jours, les cellules de Silène, un peu plus d'une semaine. Des filaments dicaryotiques se forment de préférence sur le pourtour des amas cellulaires. Leur nombre varie beaucoup selon les cultures : une dizaine dans les cas les plus favorables ; de nombreuses cultures n'en renferment qu'un ou deux, et certaines pas du tout. Avec du milieu de LESCURE neuf, le bourgeonnement des sporidies est beaucoup plus intense et les pourcentages de conjugaisons et de filaments sont plus faibles après une semaine de culture.

Des cultures effectuées dans les mêmes conditions, mais sans cellules de Silène, fournissent également des filaments. Comme par ailleurs, nous n'avons jamais constaté de contact entre un hyphe mycélien et une cellule de la plante-hôte, bien que la distance les séparant soit quelquefois très faible, on ne peut conclure à un effet favorable des cellules sur l'induction ou la croissance des filaments. Tout au plus, peut-on signaler un effet favorable des milieux conditionnés. Il peut être provoqué par l'appauvrissement du milieu ou par la présence de substances inhibitrices.

En résumé, les cultures clônales de sporidies secondaires d'<u>Ustilago violacea</u>, entretenues en milieu liquide agité depuis plus de 6 ans, gardent la possibilité de conjuguer quand on les mélange dans des conditions favorables. Les taux de conjugaison les plus élevés sont obtenus lorsque les sporidies sont prélevées dans des cultures âgées de 24 ou 48 heures, puis ensemencées en mélange à une densité initiale de 5.10 cellules/ml environ.

Les milieux dans lesquels se développent les cultures clônales inhibent plus ou moins la conjugaison. Cette inhibition, qui est totale après une dizaine de jours de culture, n'est pas due à la seule modification du pH, mais aussi à des substances rejetées dans le milieu par les sporidies végétatives ou provenant de cellules mortes.

Enfin, moins d'une conjugaison sur IO.000, produit un filament mycélien, et des essais de cultures associées avec des tissus de <u>Silene alba</u> n'ont pas permis d'obtenir des pourcentages de filaments plus importants, ni un meilleur développement de ces derniers.

CHAPITPE VII

EFFET D'UNE SOUCHE LEVUROIDE D'USTILAGO VIOLACEA SUR LA CROISSANCE DES COLONIES TISSULAIRES ET DE SUSPENSIONS CELLULAIRES DE SILENE ALBA.

Pour aborder l'étude des relations hôte-parasites entre <u>Ustilago violacea</u> et les silènes, nous avons cultivé simultanément les souches haploïdes du parasite et les tissus isolés de <u>Silene alba</u> sur un même milieu, sans que les deux éléments soient en contact l'un avec l'autre ; la croissance des colonies tissulaires et celle des suspensions cellulaires ont été mesurées afin de déterminer l'effet du champignon sur ces tissus.

Les colonies tissulaires proviennent de la souche isolée par DUBOIS et BOURIOUET, I974, et entretenue sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG contenant ${\rm IO}^{-7}$ g. ${\rm I}^{-1}$ de 2,4 D et de kinétine qui sont indispensables à sa croissance et sans effet sur Ustilago.

Nous avons réalisé les expériences avec les trois clônes B.874, B.974 et 438-34, mais les résultats étant comparables, seuls ceux obtenus avec la souche 438-34 ont été rapportés ici.

A - ACTION DU CHAMPIGNON SUR LES TISSUS ISOLES DE SILENE ALBA.

Trois expériences indépendantes, d'une durée de 30 jours chacune, ont été faites en présence du champignon ; les résultats exprimés en poids de matière fraîche (M.F.) et de matière sèche (M.S.) sont résumés dans le tableau 24.

-	! ! !EXPERIEN	ICE N° I	CROISSANCE : EXPERIENCE N° 2:EXPERIENCE N° 3			CE N° 3
1	M F	M S	M F	M S	M F	M S
! Tissu :	1561	86	1574	106	1691	107
! Tissu + :!Champignon:!	797	38	810	46	970 970	46

<u>Tableau 24</u>: Action d'<u>Ustilago violacea</u> sur la croissance des colonies tissulaires de Silene alba.

(Les expériences I, 2 et 3 sont indépendantes. Croissance de matière fraîche (M F) et sèche (M S par colonie). Les chiffres sont exprimés en mg.

La croissance des colonies tissulaires est fortement ralentie par la présence du champignon.

Afin de vérifier si l'action d'<u>Ustilago violacea</u> est spécifique ou non, nous l'avons cultivé en présence de tissus appartenant à différentes espèces végétales : carotte, érable, scorsonère ou silène, dans des boîtes de Pétri renfermant le milieu gélosé de MURASHIGE et SKOOG additionné de 2,4 D à la concentration de IO⁻⁸ pour les tissus de Carotte, IO⁻⁷ g/m1 pour le Silène et l'Erable et sans phytohormone pour les tissus de crowngall de Scorsonère.

Les mesures de matière fraîche (M F) et de matière sèche (M S) ont été réalisées après 30 jours de culture dans les mêmes conditions que dans l'expérience précédente (tableau 25).

! !	DIFFERENTS TISSUS	:	TISS	US SEULS	•	TISSUS + CHAMPIGNON		
! !		:	M F	: M S	M F	M S		
	Silène	•	2732	: : 102	: 345	II		
	Carotte	:	2124	99	402	: : I4		
	Erable	:	743	: 38	299	10		
	Scorsonère	:	2100	: I67	: IIO9	60		

Tableau 25 : Action d'Ustilago violacea sur la prolifération des tissus de carotte, d'érable, de scorsonère et de silène.

Les chiffres sont exprimés en mg.

Dans tous les cas, la présence du champignon ralentit considérablement la croissance des tissus. L'action inhibitrice ne se limite donc pas aux tissus de Silene alba.

Il nous a paru intéressant de préciser l'inhibition que provoque la souche levuroïde d'Ustilago violacea sur la prolifération cellulaire. Pour cela, nous avons fait appel à des suspensions cellulaires de Silène (souche de Silene alba isolée par DUBOIS et BOURIQUET, I974) et d'Erable (souche d'Acer pseudoplatanus isolée par LAMPORT, I964) qui ont été cultivées dans les milieux liquides de MURASHIGE et SKOOG et de LESCURE. Environ 3 g de cellules sont ensemencés dans une fiole d'attaque à fond plat de 500 ml, contenant 200 ml de milieu de culture ; différents volumes de la souche d'Ustilago violacea âgée de IO jours, cultivée en milieu liquide de LESCURE, sont ajoutés à la suspension cellulaire.

Les fioles, inclinées à 45°C, sont placées sur un agitateur rotatif tournant à la vitesse de 70 tours par minute. Les cultures sont entreposées dans une pièce à 21 ± 1°C où elles reçoivent en plus de la lumière du jour, 12 heures par jour un éclairement d'appoint fourni par des tubes luminescents.

Après IO jours de culture, la croissance des cellules est mesurée volumétriquement après décantation (tableau 26).

! VOLUME DE	:	N CELLULAIRE SILENE	SUSPENSION CELLULAIRE D'ERABLE		
! L'INOCULUM ! ! en ml	: : LESCURE :	MURASHIGE et SKOOG	: LESCURE :	MURASHIGE et SKOOG	
! 0	: : 44	40	10	I5 !	
1 0,5	: 23		_ :	_	
! !	20	10	9	6	
! ! !	: 20 :	; _ : : _ :	-	6 ! !	

Tableau 26 : Croissance des suspensions cellulaires de Silene alba et d'Acer pseudoplatanus cultivées en présence de la souche levuroïde haploïde d'Ustilago violacea sur les milieux liquides de LESCURE et de MURASHIGE et SKOOG: croissance exprimée en ml.

Les cellules de silène prolifèrent plus activement que les cellules d'érable, mais dans un cas comme dans l'autre, la présence du champignon réduit fortement la prolifération cellulaire (tableau 26). Cette inhibition pouvait être attribuée à des causes diverses :

- appauvrissement du milieu dû au développement du champignon,
- modification du pH du milieu provoqué par la présence du champignon,
- rejet par le champignon de substances inhibitrices dans le milieu de culture.

Nous avons tenté de vérifier ces trois hypothèses.

		CUNCENIKALIUN DU MILIEU DE MUNASHIGE ET SKOOG	EU DE MURASHIGE	בו שאחחת	-	
CROISSANCE	x 1/4	: : × 1/2	× 1 ×	ae ae ba	× 2	
			. Exp. 1 .	Exp. 2	Exp. 1	Exp. 2
(En absence Colonie	299	1077	1574	1691	1053	853
	38		106	107	113	87
de		• •• ••	20 00	00 00 0	•• •• •	
$\begin{array}{c c} \hline & alba \\ \hline & & \\ \hline \\ \hline$	376	503	810	. 026	706	739
				947	74	9
d'Ustilago violacea	+	+ +	+ + +	96 09 9	+ +	+ +

Tableau 27 : Action de différentes concentrations du milieu de MURASHIGE et SKOOG, sur la croissance des tissus de Silene alba et de la souche lévuroïde d'Ustilago violacea.

Durée de la culture : expérience n^{o} 1 : 27 jours . expérience n^{o} 2 : 25 jours

\$ 10. Ju

B - L'INHIBITION EST-FLLE DUE A UN APPAUVRISSEMENT DU MILIEU DE CULTURE ?

Nous avons comparé la croissance du tissu cultivé seul ou en présence du champignon sur des milieux de MURASHIGE et SKOOG gélosés dont les éléments minéraux et organiques sont soit dilués au I/2 ou au I/4, soit multipliés par 2 (tableau 27). Les expériences sur le milieu normal et celles sur le milieu deux fois concentré ont été répétées deux fois.

Le milieu de MURASHIGE et SKOOG habituel est celui qui assure la meilleure croissance du tissu, alors que le champignon se développe mieux sur le milieu deux fois plus concentré. Quelle que soit la concentration du milieu, la prolifération est toujours plus faible en présence du champignon. Lorsque l'on cultive simultanément tissu et champignon sur le milieu deux fois concentré, <u>Ustilago</u> utilise une partie des substances nutritives et réduit la concentration du milieu qui devrait être alors plus favorable à la croissance des colonies tissulaires. Or, il n'en est rien puisque la présence du champignon ralentit la prolifération du tissu. L'inhibition ne semble donc pas pouvoir être attribuée à l'épuisement du milieu de culture.

C - L'INHIBITION EST-ELLE DUE A UNE MODIFICATION DU PH DU MILIEU DE CULTURE ?

Lorsque nous cultivons <u>Ustilago</u> (souche de BAARN) dans la solution nutritive de MURASHIGE et SKOOG, le pH du milieu passe de 4,6 à 3 en fin de culture. Nous avons donc recherché quels pouvaient être, sur la prolifération des colonies tissulaires de <u>Silene alba</u>, les effets de milieux plus ou moins acides, tamponnés (tableau 28) ou non (tableau 29).

Le pH est ajusté par HCl O,I N après autoclavage, de manière à éviter l'hydrolyse de la gélose. Les tissus sont pesés après 25 jours de culture et le pH du milieu est à nouveau mesuré.

! !pH du milieu !	- initial	: 3	3,5	44	4,5	5,I
	- final	: 4	4,3	4,3	: 4,4	: 4,4 :
!	mg MF/ colonie	1795	1629	I547	1591	I393
! Croissance !	mg MS/ colonie	95	91	90	92	77

Tableau 28 : Action du pH sur la croissance des tissus de Silene alba

! !pH du milieu !	- initial	3	3,5	4	4,5	5
	- final	3,4	3,7	4	4,5	4,8
!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!	mg MF/ colonie	958	I496	: : 1368	: : 1486	: 1312
Croissance!	mg MS/colonie	58	87	77	88	77

Tableau 29 : Action du milieu de culture tamponné par du Tris HCl 0,0I M sur la croissance des colonies tissulaires de Silene alba

Le pH initial du milieu, lorsqu'il n'est pas tamponné, n'a que peu d'effet sur la croissance du tissu qui tend à l'ajuster au cours de la culture (GAUTHERET, 1959).

Lorsque le milieu est tamponné (Tris HCl 0,0I M), les colonies tissulaires ajustent plus difficilement le pH; leur prolifération est cependant peu modifiée, sauf à pH 3.

Dans ce cas, le milieu est encore très acide à la fin de la culture, mais la réduction de la croissance est plutôt la conséquence d'une dilution de la solution nutritive, provoquée par l'addition d'une quantité plus importante d'HCl 0,I N; elle est d'ailleurs hors de proportion avec l'inhibition provoquée par la présence du champignon.

- D REJET PAR LE CHAMPIGNON DE SUBSTANCES INHIBITRICES
 DANS LE MILIEU DE CULTURE.
- a) Effet du milieu de culture du champignon sur la croissance des colonies tissulaires de Silene alba :

Puisque l'inhibition de croissance provoquée par Ustilago violacea n'est pas due à l'épuisement du milieu ou à une simple modification du pH, nous avons voulu vérifier si elle provenait de substances excrétées par le champignon dans le milieu de culture. Pour cela, nous avons cultivé pendant 30 jours le champignon en milieu liquide. Après filtration, nous avons recueilli le milieu de dix fioles que nous avons concentré sous vide, puis incorporé, à volume égal, avant ou après autoclavage, aux milieux gélosés sur lesquels nous avons repiqué les colonies tissulaires de silène. De façon à modifier le moins possible la concentration des éléments minéraux et organiques présents dans ces milieux, la concentration de chaque constituant a été arbitrairement multipliée par deux (tableau 30).

!		CROIS	SANC	E
MILIEU	: EXPERIE	NCE N° I:	EXPERIE	NCE N° 2!
!	M F	M S	M F	M S
! Témoin	: : I56I :	86	I574	! ! 106 !
!Filtrat incorporé !avant autoclavage	1318	60	948	81
: !Filtrat incorporé !après autoclavage !	920	75	1162	119

Tableau 30 : Effet du filtrat d'une culture du champignon sur la croissance des colonies tissulaires de <u>Silene alba</u>
Les chiffres sont exprimés en mg.

Le filtrat des cultures lévuroïdes d'<u>Ustilago</u> ralentit la croissance des tissus. Il renferme donc probablement des substances inhibitrices excrétées par le champignon. Il faut toutefois noter que certains constituants du milieu de culture du champignon, qui n'auraient pas été entièrement consommés au cours de son développement, sont susceptibles de modifier ultérieurement la prolifération des colonies tissulaires de silène.

b) Effet du milieu de culture du champignon sur la croissance d'une suspension cellulaire de Silene alba:

Afin de préciser les résultats obtenus sur les colonies tissulaires, nous avons étudié l'effet du milieu de culture du champignon sur la suspension cellulaire. Deux expériences à différents pH ont été réalisées pour comparer l'action de ce facteur à ce qui a été observé avec les colonies tissulaires. La suspension cellulaire est beaucoup plus sensible à l'effet inhibiteur du filtrat de culture du champignon (tableau 31).

	VOLUME DE FILTRAT AJOUTE A UNE CULTURE (m1)							
CROISSANCE	. 0 : 1	5	10 !					
! ! !	EXP. EXP. EXP. EXP. N° I N° 2		EXP. EXP. ! N° I N° 2 !					
! IO ^{-I} g MF/ ! culture	606 534 202 232	5 35	2 7					
! IO ⁻² g MS/ culture	: 330: 305: I04: I07 : : : : :	: 4 : 25	: 3 : 7 ! : : : !					

Tableau 3I : Effet du filtrat d'une culture du champignon sur la croissance d'une suspension cellulaire de Silene alba

Exp. n° I pH du filtrat : 3,0 } durée de culture : Exp. n° 2 pH du filtrat : 5,7 } deux semaines

Un ml de filtrat, ajouté à une suspension cellulaire de 200 ml, réduit la croissance des cellules d'environ 30 %. Cette importante inhibition n'est pas due au pH très acide (3,0) du filtrat puisqu'elle persiste lorsqu'on le ramène à 5,7, c'est-à-dire au pH normal du milieu de LESCURE. La réduction de la croissance n'est pas imputable non plus à une modification importante de la concentration du milieu de culture : le volume du filtrat ajouté étant cette fois négligeable par rapport au volume du milieu utilisé pour cultiver la suspension cellulaire.

En résumé, le champignon réduit la croissance des tissus de silène, de carotte, d'érable et de scorsonère, cultivés in vitro. Cette inhibition n'est pas due à une compétition pour l'utilisation des éléments nutritifs présents dans le milieu de culture, ni à une acidification de ce dernier ; elle est vraisemblablement provoquée par des substances excrétées par le champignon au cours de son développement. La différence de sensibilité manifestée par les colonies tissulaires et les suspensions cellulaires peut s'expliquer par le fait que les dernières baignent dans la solution nutritive, tandis qu'une partie seulement des premières est en contact avec le milieu solide. Les phénomènes de diffusion sont également beaucoup plus rapides dans un milieu liquide que dans un milieu solide.

Si la souche lévuroïde d'<u>Ustilago</u> réduit la croissance des tissus isolés de silène, il est peu probable que les substances excrétées par cette souche puissent provoquer les modifications florales induites par le mycélium. Néanmoins, il serait intéressant de préciser la nature des substances, en particulier les enzymes, et les acides aminés libres et protéiques qu'une telle souche libère au cours de sa croissance pour rechercher les causes de cette inhibition.

CHAPITRE VIII

DANS LE MILIEU DE CULTURE D'USTILAGO VIOLACEA.

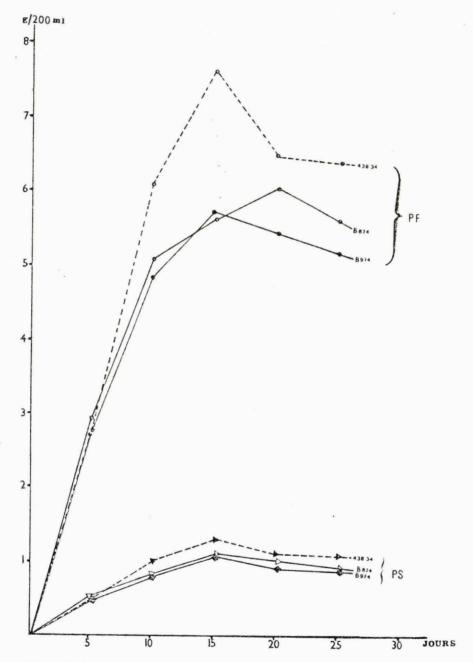
Certains champignons parasites cultivés en dehors de leur hôte libèrent, dans leur milieu de culture, différents composés, en particulier des acides aminés (REDDY et RAO, 1975; VIJAYA KUMAR et RAO, 1976 et 1977) et des enzymes (HANSSLER et coll., 1977).

Sachant que la souche haploïde d'<u>Ustilago violacea</u> excrète, au cours de son développement, des composés inhibiteurs de la croissance des tissus isolés de <u>Silene alba</u>, il nous a semblé intéressant de détecter, dans le milieu de culture de ce champignon, les acides aminés libres et protéiques et certaines enzymes libérées au cours de sa croissance.

Cette étude a été réalisée sur les trois clônes B.874 et B.974, qui sont compatibles, et 438-34 de BAARN; la méthode de LOWRY et Coll. (I95I) a servi au dosage des protéines totales et celle de API-ZYM (I977) pour la recherche des activités enzymatiques. Nous avons déterminé les acides aminés libres et protéiques selon le protocole décrit précédemment. Dans ce dernier cas, tous les résultats sont exprimés en nanomoles d'acides aminés pour une prise d'essais de 0,I ml. Toutes les expériences ont été renouvelées trois fois.

A) Evolution des protéines excrétées au cours de la croissance :

Pour les trois souches d'<u>Ustilago</u>, la phase exponentielle de croissance se situe entre le 5ème et le IOème jour (fig. IO); elle ralentit jusqu'au I5ème jour, à l'exception de B.874 dont la croissance peut atteindre le 20ème jour. Le poids sec suit



Fig, IO - Croissance en milieu liquide de trois souches d'Ustilago violacea: 438-34, B 974 et B 874. PF: poids frais. PS: poids sec.



la même variation bien que les cellules du B.874 soient turgescentes entre le I5ème et le 20ème jour, ce qui explique la baisse du poids sec pendant que le poids frais augmente faiblement (fig. IO).

A ce stade, la souche de BAARN est constituée de filaments isolés dont les cellules mycéliennes sont apparemment dépourvues de globules lipidiques. Les souches B.874 et B.974 de forme lévuroïde, sont rarement bourgeonnantes et les cellules renferment chacune une énorme vacuole.

A partir du I5ème jour, la diminution du poids sec des trois souches indique le début de lyse des cellules (fig. IO).

Parallèlement à cette évolution de la croissance, la libération des protéines dans le milieu est d'abord lente du Ier au 5ème jour (fig. II), puis s'accélère activement entre le 5ème et le IOème jour pendant la phase active de croissance; elle s'arrête plus tôt pour les souches B.874 et B.974 que pour la souche de BAARN (438-34) qui excrète encore jusqu'au I5ème jour. A partir de ce délai, le taux de protéines dans le milieu baisse pour les trois souches, puis augmente à nouveau fortement à partir du 25ème jour. La diminution momentanée de la teneur en protéines peut s'expliquer, soit par leur hydrolyse, soit par leur réutilisation par les cellules sénescentes.

L'augmentation considérable observée au 25ème jour est sans doute liée à l'autolyse des cellules en fin de culture (fig. II).

D'ailleurs, à ce stade, les souches manifestent des modifications morphologiques qui se traduisent pour la souche de BAARN, par des filaments mycéliens fortement agglutinés, présentant de nombreuses ramifications riches en lipides. Les souches lévuroïdes B.874 et B.974 s'agglutinent également et même, dans certains cas, prennent un aspect filamenteux.

Il est probable que le milieu devenu défavorable entraîne la formation d'éléments de conservation caractérisés par une paroi épaissie (BATCHO, 1973).

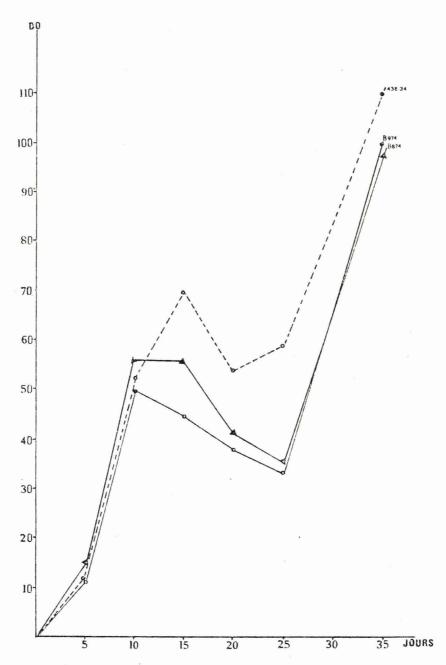


Fig. II - Évolution des protéines totales excrétées au cours de la croissance de trois souches d'Ustilago violacea : lecture de la densité optique (DO), 750nm.



B) Acides aminés libres :

Dans le filtrat de culture des trois souches, on trouve les mêmes acides aminés libres : acide aspartique, glycocolle et alanine. Ils sont en quantités trop faibles pour pouvoir être dosés par notre technique. Les souches compatibles B.874 et B.974 en contiennent toutefois un peu plus que celle de BAARN (438-34).

Dans les trois filtrats, il n'y a ni acide aminé basique, ni acide aminé cyclique.

C) Acides aminés protéiques :

L'arginine, la lysine, l'histidine et la valine sont en faible quantité dans le filtrat des trois souches (tableau 32); les autres acides aminés et particulièrement la tyrosine et la phénylalanine sont en quantité supérieure dans le filtrat du B.974.

Les analogies entre la souche de BAARN(438-34) et B.874 suggèrent qu'elles sont peut-être de même signe et, de ce fait, B.974 et 438-34 devraient être compatibles, parce que de signes contraires. Toutefois, la souche de BAARN, isolée depuis de nombreuses années (1934) a perdu tout pouvoir de conjugaison, ce qui ne permet pas de vérifier cette hypothèse.

En résumé, les trois souches excrètent les mêmes acides aminés protéiques, et parmi ceux-ci les acides aminés acides (acides glutamique, aspartique) sont les plus importants (tableau 32).

D) Détermination des enzymes libérées dans le milieu :

Parmi les vingt enzymes identifiables par la méthode de microdosage semiquantitative d'API-ZYM, seulement quatre ont été trouvées dans les filtrats d'<u>Ustilago violacea</u>. Ce sont la phosphatase alcaline, la phosphatase acide, la phospho

		: :	B.874	: :	3.974	43	! 38-34 !
! ! A !	CIDES AMINES	: :LIBRES	: S:PROTEIQUES :	LIBRES	: PROTEIQUES	LIBRES	PROTEIQUES!
! !	Glycocolle	: : ++	: 2,67	: ++ :	7,100	: : +	3,78
! ! ! S	Alanine	: : ++	2,28	: ++ :	5,40	: + :	2,52
і я і п	Valine	: :	: : +		+	:	: + ! : + !
	Leucine	• •	1,20	•	4,09	•	2,46 !
: — ! ш	Isoleucine	:	0,66	• (2,35	•	1,79
!	Sérine	• •	3,45	a (10,75		5,02
!!!	Thréonine	: :	2,36	•	7,48		4,29
	Ac. Aspartique	: ++	4,21	++	10,65	+	6,83
ACIDES	Ac. Glutamique	:	3,67	:	10,07	: :	5,83
FS JES	Lysine	:	: ++	•	++		++ !
BASIQUES	Arginine	: :	÷ +		+	:	+ !
: S	Histidine	: :	: ++	:	++		++ !
CYCL IQUES	Tyrosine	:	: ++	•	4,06	: :	++ !
CYCI	Phénylalanine	: : :	: :		4,00		++ !
!	GLeN	: :	3,76	:	7,78		4,25 ! !

Tableau 32 : Teneur en acides aminés libres et protéiques excrétés par <u>Ustilago violacea</u> dans son milieu de culture.

+ , ++ , +++ , signes arbitraires pour l'évaluation approximative des quantités non dosables par l'autoanalyseur.

Les valeurs numériques sont exprimées en nanomoles.



amidase et l'estérase lipase (tableau 33). La phosphatase alcaline est plus importante dans le 438-34 que dans les deux autres, alors que la phosphatase acide quantitativement la plus importante des enzymes, est excrétée de façon équivalente par les trois souches. L'estérase lipase est la plus faiblement représentée.

Pour les deux souches compatibles B.874 et B.974, le rapport quantitatif des quatre enzymes est identique.

En résumé, les filtrats de culture d'<u>Ustilago violacea</u> sont pauvres en acides aminés libres ; l'acide aspartique, le glycocolle et l'alanine ont été mis en évidence dans les trois souches.

Cette carence en acides aminés libres se retrouve dans le filtrat de culture d'Alternaria solani (ELL. et MART.) N. qui n'en renferme qu'un seul (arginine) (VIJAYA KUMAR et RAO, 1977) et dans celui d'Alternaria alternata (FR.) K. qui n'en contient aussi qu'un seul à l'état libre (BINOD et coll., 1976). Cependant, la souche virulente de Rhizoctonia solani (KUHN. et R.) excrète dans son milieu de culture, la sérine, la thréonine, l'histidine, la tyrosine et la valine, alors que la souche non virulente n'excrète que la thréonine et la tyrosine (REDDY et RAO, 1975).

Dans le cas qui nous intéresse, la détermination de la nature des produits excrétés par <u>Ustilago violacea</u> pourrait permettre de préciser leur rôle, soit dans la compatibilité des cellules du champignon, soit dans la réduction de la croissance des tissus de Silène, leur hôte naturel, soit dans les troubles métaboliques provoqués par sa présence lorsqu'il vit en parasite aux dépens des Caryophyllacées.

C'est au cours de la phase active de croissance et en fin de culture que l'excrétion des protéines est la plus importante ; les phosphatases (acide et basique), la

	•	and the second second second	0		0	1
	•	B.874		B.974	· • 438-34	1
	:	5.074	•	0.774	: 4,00-,4	!
!	:		:		•	!
! Phosphatase alcaline		+	:	+	: +++	Ĭ
!	9		•		•	!
!	0		•		0	!
! Phosphatase acide	9	+++	9	+++	: +++	!
1	0				•	!
!	:		0		•	!
! Phosphoamidase	0	++		++	: ++	į
!	:		9		:	ļ
!	:		:		:	!
! Estérase Lipase	:	+	:	+	: +	!
!	:		:		:	!
!	:		0	W-000	:	!

Tableau 33 : Identification et dosage des activités enzymatiques dans le filtrat de culture d'<u>Ustilago violacea</u>.

+ , ++ , +++ , signes arbitraires pour l'évaluation de l'activité enzymatique



phosphoamidase et la lipase estérase ont été identifiées dans le filtrat des trois souches. Ces enzymes ont été également trouvées dans le milieu de culture des suspensions cellulaires de <u>Silene alba</u>; elles ne sont donc pas responsables de l'inhibition de croissance des tissus isolés de silènes lorsqu'ils sont cultivés en présence du champignon (BATCHO, 1973).

L'identification des acides aminés protéiques montre que les mêmes composés sont excrétés par les trois souches. Seuls les acides aminés acides (acide aspartique, acide glutamique) produits en plus grande quantité pourraient éventuellement jouer un rôle dans l'inhibition de la conjugaison des clônes compatibles, des travaux antérieurs (DUBOIS et coll., 1977) ayant montré que les pH acides sont défavorables à la conjugaison.

Ces produits d'excrétion (acides aminés, protéines et enzymes) sont vraisemblablement des déchets métaboliques éliminés au cours de la croissance des souches d'Ustilago violacea. Aucun d'eux ne semble responsable ni de la compatibilité des souches du champignon, ni de la réduction de croissance des colonies tissulaires des silènes. Par contre, leur éventuelle excrétion dans la plante hôte pourrait être à l'origine de troubles métaboliques.

Il faut signaler toutefois que le mycélium dicaryotique d'<u>Ustilago violacea</u>, qui vit en parasite dans les Caryophyllacées, pourrait libérer des produits autres que ceux de la forme lévuroïde cultivée en milieu artificiel ; mais le fait que l'on retrouve les mêmes enzymes, les mêmes acides aminés libres et protéiques dans tous les filtrats de culture constitue un caractère commun qui pourrait être spécifique d'<u>Ustilago</u> violacea.

CHAPITRE IX

INFECTION EXPERIMENTALE DE SILENE ALBA ET S.DIOICA PAR USTILAGO VIOLACEA.

Les sporidies provenant des téliospores obtenues <u>in vitro</u> rejettent, dans leur milieu de culture, des substances toxiques à l'égard de la croissance des tissus de silènes.

Après avoir déterminé les conditions de conjugaison de ces sporidies, nous avons tenté d'infecter des plantules, des rosettes et des fragments de tiges, par des inoculums d'origines différentes (souche haploïde, suspension de téliospores, sporidies conjuguées et mycélium dicaryotique), afin de déterminer leur pouvoir pathogène et aussi, de préciser le stade de développement des silènes le plus favorable à la pénétration du parasite.

A - ACTION D'UNE SOUCHE LEVUROIDE HAPLOIDE D'USTILAGO VIOLACEA SUR LES FRAGMENTS DE TIGES DE SILEME ALRA.

par la souche lévuroïde, les tiges secondaires formées <u>in vitro</u> sont tout à fait semblables aux tiges saines observées au cours de l'étude de la floraison <u>in vitro</u>. Les colonies lévuroïdes se multiplient rapidement sur les explantats et atteignent la surface du milieu de culture où elles constituent une masse pâteuse autour des noeuds. Aucune structure mycélienne n'a été observée. Le phénomène de castration parasitaire qui caractérise le développement du champignon dans l'hôte n'a pas été observé dans cette expérience qui portait sur I5 paniers de 24 tubes de culture. Par ailleurs le nombre anormalement faible

de reprises des explantats laisse supposer que les colonies lévuroïdes haploïdes d'<u>Ustilago violacea</u> gènent le développement des noeuds cultivés in vitro.

B - ACTION D'UNE SOUCHE LEVUROIDE HAPLOIDE D'USTILAGO VIOLACEA SUR LES PLANTULES DE SILENE ALBA.

Les plantules immergées pendant six heures dans l'inoculum sont ensemencées sur le milieu gélosé de MURASHIGE et SKOOG contenu dans des flacons à large ouverture.

Après 4 jours de culture, correspondant à la période d'adaptation des plantules sur leur nouveau milieu, la reprise paraît bonne. Un mois plus tard, alors que les témoins se développent normalement, qu'ils forment de nouvelles feuilles et que leurs tiges s'épaississent, la croissance des plantules infectées est bloquée par le développement très rapide des sporidies qui couvrent presque toute la surface du milieu de culture. Après deux mois, la presque totalité des plantules infectées meurt intoxiquée par la présence du champignon.

La souche haploïde d'<u>Ustilago violacea</u> qui s'était déjà révélée inhibitrice de la croissance des colonies tissulaires de <u>Silene alba</u> et incapable de sporuler sur les explantats cultivés <u>in vitro</u>, est aussi toxique pour le développement des plantules de silène.

C - <u>INFECTION DE NOEUDS PROVENANT DE TIGES SAINES PAR LE</u> MYCELIUM DICARYOTIQUE.

Des noeuds prélevés sur des tiges saines, mis en contact avec des fragments de tissu parasité renfermant le mycélium dicaryotique, sont ensemencés sur le milieu gélosé de MURASHIGE et SKOOG.

A partir du 2ème jour de culture, la plupart d'entre eux sont envahis par des champignons autres qu'<u>Ustilago violacea</u>; quand nous avons pu éviter ces pollutions, les fleurs néoformées

sont indemnes du champignon. L'hypothèse qui consistait à croire que le mycélium dicaryotique contenu dans les tissus parasités passerait dans les tissus sains, n'a malheureusement pas pu être vérifiée.

D - INFECTION DES SILENES PAR LES TELIOSPORES OU LES SPORIDIES CONJUGUEES D'USTILAGO VIOLACEA.

a) Infection des plantules de Silene alba cultivées en serre :

Des plantules de <u>Silene alba</u> âgées de deux semaines sont immergées pendant 6 heures dans une suspension renfermant à la fois des téliospores, des sporidies haploïdes et des sporidies conjuguées. Elles sont ensuite repiquées en pots. Après un mois de culture, ces plantules forment des rosettes comparables à celles obtenues avec des plantes n'ayant pas été soumises à l'action du champignon.

Les premiers boutons floraux apparaissent après deux mois et les fleurs s'épanouissent deux semaines plus tard.

Dans ce cas, nous avons pu constater que II pieds mâles sur I4 et I8 pieds femelles sur 2I étaient parasités par Ustilago violacea. Toutefois, la méthode utilisée ne permet pas de savoir si l'agent infectieux est représenté par les téliospores ou les sporidies conjuguées.

b) Les rosettes cultivées en serre :

Les rosettes de <u>Silene alba</u> sont infectées au niveau du bourgeon terminal par une suspension concentrée de téliospores. Quatre mois plus tard, 6 plantes sur IO portaient des fleurs dont la moitié (2 pieds femelles et I pied mâle) étaient parasitées par Ustilago violacea.

c) Les fragments de tiges de Silene alba cultivés in vitro :

Des noeuds provenant de plantes saines sont infectés par une suspension de téliospores. Un mois plus tard, IO5 explantats sur I44 portaient des fleurs. Une observation rigoureuse des fleurs mâles et femelles ne révèle aucune modification caractérisant la présence d'<u>Ustilago violacea</u>.

Les téliospores se sont montrées pathogènes sur les rosettes cultivées en serre et, probablement, sur les plantules cultivées dans les mêmes conditions. Les résultats négatifs enregistrés sur les noeuds cultivés <u>in vitro</u> seraient peut-être provoqués par une mauvaise germination des téliospores.

E - INFECTION DES SILENES PAR LES SPORIDIES CONJUGUEES.

a) Silènes cultivées en serre :

I - Les plantules :

Les plantules infectées par immersion dans la suspension de sporidies conjuguées se développent en rosettes. A la montaison, 6 pieds femelles et 9 pieds mâles étaient parasités. La montaison n'était pas synchrone pour toutes les plantes et les pieds mâles étaient les premiers à fleurir un mois avant les femelles.

Signalons que l'infection artificielle de ces pieds a été réalisée à partir de dicaryons provenant de la germination des téliospores récoltées dans les anthères de <u>Silene alba</u>; c'est donc le même <u>Ustilago violacea</u> qui parasite les deux espèces de silène.

Nous avons, par ailleurs, infecté de jeunes plantules en n'immergeant que les racines dans l'inoculum, afin de savoir si tous les organes étaient réceptifs et si les racines pouvaient être une voie d'infection. L'expérience est identique à la précédente, mais seules les racines sont restées pendant 6 heures en présence de l'inoculum.

Les plantules sont ensuite repiquées en serre. I5 pieds mâles sur I6 et 9 pieds femelles sur I2 étaient parasités par Ustilago violacea.

La méthode d'infection par la racine donne donc des résultats positifs qui montrent que les racines peuvent constituer une voie de pénétration du parasite.

2 - Rosettes de Silene alba et S.dioica :

Afin de vérifier que le stade plantule n'était pas le seul sensible à <u>Ustilago violacea</u>, nous avons réalisé des infections expérimentales quand les plantes (âgées d'environ 4 mois) avaient atteint le stade de rosette. Nous avons alors injecté au mois de Mai, l'inoculum constitué de dicaryons au niveau de bourgeons terminaux de <u>Silene alba</u> et <u>S.dioica</u>.

L'expérience a porté sur 5 pots de chaque espèce, 3 pieds femelles et I pied mâle de l'espèce <u>alba</u> étaient parasités par <u>Ustilago violacea</u>; le 5ème pot est resté en rosette jusqu'à la fin de l'expérience.

L'espèce <u>dioica</u> présentait un pied mâle et un pied femelle parasités ; 2 pieds mâles portaient des fleurs parfaitement saines et un pied est resté à l'état de rosette.

b) Silènes cultivés en champ:

Les rosettes de <u>Silene alba</u> et <u>S.dioica</u> infectées de la même façon que celles maintenues en serre, sont cultivées dans un champ où elles ont passé l'hiver. A la belle saison, elles se développent et fleurissent. Dans le cas de <u>Silene alba</u>, IO pieds mâles sur I5 et I8 pieds femelles sur I9 étaient parasités; avec <u>Silene dioica</u>, 5 pieds mâles sur I0 et 7 pieds femelles sur I0 étaient également parasités.

Ainsi, les plantes au stade rosette peuvent être infectées et le champignon résiste au froid hivernal.

Nous avons également réalisé des infections avec les deux souches B.874 et B.974, haploïdes et compatibles, réunies quelques minutes seulement avant l'expérience, de façon à ce que l'infection soit réalisée par des sporidies non conjuguées. Cette suspension a été injectée à des rosettes de <u>Silene dioica</u>. 4 pieds mâles sur 5 et 5 pieds femelles sur 5 étaient parasités à la fin de l'expérience.

En conséquence, les sporidies conjuguées (dicaryons) ont un pouvoir pathogène à l'égard des deux espèces de silènes, quel que soit leur stade de développement, qu'eller soient cultivées en serre ou en champ. D'autre part, il n'est pas indispensable d'attendre que les sporidies conjuguent pour réaliser ces infections, puisque la réunion de deux clônes compatibles suffit pour provoquer le phénomène de castration parasitaire sur Silene alba et S.dioica.

c) Silènes cultivés in vitro :

Après avoir montré qu'il était possible d'obtenir <u>in vitro</u> des fleurs de silènes parasitées par <u>Ustilago violacea</u>, à partir d'explantats déjà infectés dans la nature, et qu'il était aussi possible de réaliser des infections artificielles sur des plantes entières cultivées en pot, nous avons tenté d'infecter, à l'aide de dicaryons, des plantes entières cultivées aseptiquement, des fragments de tiges ou des colonies tissulaires cultivées <u>in vitro</u>.

I) <u>Les plantules de Silene alba</u>:

Des graines de <u>Silene alba</u> sont mises à germer dans des conditions aseptiques ; lorsque les plantules ont atteint 3 cm, elles sont immergées pendant 6 heures dans l'inoculum constitué par une suspension de dicaryons.

Elles sont ensuite transplantées sur un milieu gélosé comprenant les éléments nutritifs de la solution de MURASHICE et SKOOG et 3 % de glucose. Le développement des plantules est tout d'abord normal, elles ne tardent pas à former de petites rosettes, mais leur croissance s'arrête rapidement. Pendant ce temps, sporidies et dicaryons se multiplient très activement par bourgeonnement, forment des colonies qui s'étalent et s'épaississent à la surface du milieu, inhibent les plantules qui jaunissent et se nécrosent.

2) Fragments de tiges :

Des explantats prélevés au niveau des noeuds de tiges saines de <u>Silene alba</u> et <u>S.dioica</u> sont préparés pour être cultivés <u>in vitro</u>. Au moment de l'ensemencement, on les infecte à la seringue au niveau du bourgeon axillaire, avec 0,I ml environ d'un inoculum constitué par une suspension de sporidies conjuguées.

Après un mois de culture, l'espèce <u>S.alba</u> présente 17 explantats sur 73 portant des fleurs parasitées (PL.IV - fig. 2). Quant à l'espèce <u>S.dioica</u>, le nombre d'explantats ayant fleuri était faible parce que les noeuds étaient déjà très lignifiés. Néanmoins, 5 pieds sur 13 étaient infectés par le champignon.

Nous avons recommencé la même expérience en variant le mode d'inoculation. Au lieu d'injecter, nous déposons à la seringue une goutte correspondant à 0,I ml de la suspension de dicaryons : seulement 6 explantats de <u>Silene alba</u> sur 84 étaient parasités par <u>Ustilago</u> violacea.

Au cours de ces expériences d'infections expérimentales, le seul critère que nous avons retenu pour affirmer que la plante était ou non parasitée, était la présence des fleurs charbonnées (PL.III - fig. 4 et 6). Il est possible que d'autres explantats n'ayant pas encore fleuri, renferment aussi du mycélium dicaryotique, mais nous n'avons pas fait d'observations cytologiques.

Quoi qu'il en soit, ces essais montrent cependant que le cycle complet d'<u>Ustilago violacea</u> peut être obtenu dans des conditions rigoureusement contrôlées.

3) <u>Les tissus isolés de Silene alba</u>:

Nous nous sommes demandés si <u>Ustilago violacea</u>, parasite obligatoire, pouvait effectuer son cycle de développement en présence de tissus de l'hôte, sans différenciation florale. Nous avons donc mis en culture (milieu de MURASHIGE et SKOOG, 3 % de glucose, 2,4 D 10^{-7}), des fragments de 250 mg prélevés sur des colonies tissulaires de <u>Silene alba</u>. A l'aide d'une seringue, nous déposons à la surface des explantats environ 0,I ml d'inoculum (suspension de sporidies conjuguées).

La présence du champignon réduit très fortement la croissance des tissus qui finissent par se nécroser, alors que les sporidies se multiplient rapidement, envahissent les tissus et le milieu de culture.

Une observation au microscope montre que les sporidies qui se développent fusionnent entre elles sans donner de filaments mycéliens. Nous n'avons pas observé non plus la formation des téliospores sur ces tissus.

Nous avons recommencé l'expérience en infectant les tissus lorsque les colonies tissulaires sont en pleine croissance (environ 2 g). La goutte d'inoculum est déposée de façon qu'il n'y ait aucun contact entre le champignon et le milieu de culture. Le résultat est le même que précédemment avec un délai plus long. En résumé, nous constatons que les clônes B.874 et B.974 d'<u>Ustilago violacea</u> que nous avons isolés au laboratoire depuis 6 ans et entretenus régulièrement dans des conditions aseptiques, ont conservé leur pouvoir pathogène. Toutefois, comme cela avait déjà été signalé (HASSAN et MAC DONALD, I97I), nous confirmons que les sporidies haploïdes qui ne peuvent pas produire de filaments dicaryotiques sont incapables de parasiter les silènes, alors que les sporidies conjuguées ont un bon pouvoir pathogène.

Les inoculums que nous avons utilisés proviennent de téliospores récoltées dans des anthères de <u>Silene alba</u>; ils sont susceptibles d'infecter aussi <u>Silene dioica</u>, ce qui souligne qu'<u>Ustilago violacea</u> n'a pas de spécificité très stricte. De plus, la pénétration du champignon dans les tissus de l'hôte semble se faire de façon identique dans les pieds mâles et femelles des deux espèces.

Les essais réalisés sur les plantes entières ont permis de montrer que l'infection pourrait avoir lieu à différents stades de développement de la plante. La pénétration du parasite peut se faire par différents organes, les bourgeons et les racines étant particulièrement favorables à cette pénétration. Par ailleurs, alors que la température et la lumière jouent un rôle important dans la floraison des silènes, il semble que le champignon résiste très bien au froid hivernal. Ustilago violacea est certes un parasite strict, c'est-à-dire qu'il ne peut pas effectuer son cycle de développement sur milieu synthétique actuellement connu; mais il ne le peut non plus sur les cellules vivantes des colonies tissulaires de Silene alba ; il semble donc que les relations hôte-parasites soient très étroites, et que le champignon ne puisse réaliser son développement complet que par l'intermédiaire des anthères de silènes, sans qu'on sache d'ailleurs exactement pourquoi.

Du reste, après avoir obtenu la floraison <u>in vitro</u> des silènes, nous avons réalisé le cycle du champignon dans des conditions rigoureusement contrôlées et dans un délai relativement court (I mois).

CHAPITRE X

FTUDES CYTOLOGIQUES DES MODIFICATIONS STRUCTURALES PROVOQUEES PAR USTILAGO VIOLACEA CHEZ SILENE DIOICA.

Les modifications morphologiques provoquées par ce parasite considéré comme obligatoire ont été décrites par WANG (1934) qui a dressé un inventaire du genre <u>Ustilago</u> et décrit l'action du parasite dans les fleurs de différentes espèces. BAKER (1947) précise que chez <u>Silene dioica</u>, l'étamine est le seul organe où <u>Ustilago violacea</u> produit des téliospores. GIULIANO (1962), puis EVANS et WILSON (1971) décrivent le trajet du mycélium dans son hôte.

Ces travaux sont réalisés essentiellement en microscopie optique (M.O.), et il est opportun de préciser les relations du parasite avec les cellules de l'hôte, à l'aide de la M.O. et surtout à l'échelle de la microscopie électronique à transmission (M.E.T.).

Nous rechercherons le parasite d'abord dans les tissus végétatifs de l'hôte (<u>Silene dioica</u>) avant d'étudier son action au niveau des fleurs mâles et femelles. Cette action étant la même chez <u>Silene dioica</u> que chez <u>S.alba</u>, nous ne rapporterons ici que les observations réalisées sur la première espèce.

A - LOCALISATION D'USTILAGO VIOLACEA DANS LES TISSUS VEGETATIFS DE SILENE DIOICA.

En général, chez <u>Silene dioica</u>, il est très difficile de distinguer une plante saine d'une plante parasitée avant la floraison; les travaux de BATCHO et ZAMBETTAKIS (1975) ont montré que les différences observées par BAKER (1947) ne se manifestent pas toujours. Toutefois, le parasite séjourne dans les silènes puisque des plantes parasitées artificiellement il y a six ans et cultivées en serre, produisent, chaque été, des tiges qui portent des fleurs parasitées (BATCHO et

ZAMBETTAKIS, 1976).

C'est la raison qui nous a amené à rechercher le parasite dans la plante au stade végétatif, en particulier dans les méristèmes des bourgeons apicaux ou axillaires. Ces bourgeons, sains et parasités par <u>Ustilago violacea</u>, proviennent de cultures en serre et ont été traités selon le protocole habituel pour la M.O. et la M.E.T.

<u>Ustilago violacea</u> se comporte de façon analogue dans les plantes mâles et femelles de <u>Silene dioica</u>; nous nous contenterons donc de comparer des méristèmes de plantes saines et parasitées, sans distinction de sexe.

a) Cellules des apex non parasités :

En microscopie optique, l'apex a la forme d'un dôme présentant de chaque côté, les initiums foliaires (PL.V - fig. I). Il est constitué de deux assises superficielles (PL.V - fig. 2), d'une zone axiale (PL.V - fig. 3) et des zones latérales considérées comme très actives du point de vue mitotique. (NOUGAREDE, 1965).

Les cellules sont toutes semblables au niveau des assises superficielles; chacune renferme un noyau qui occupe plus de la moitié du cytoplasme. Les parois pectocellulosiques sont fines et ne ménagent pas de méats intercellulaires (PL.V - fig. 2 et 4). Dans le cytoplasme, les mitochondries, très nombreuses et de petite taille sont pauvres en crêtes, les plastes et les vacuoles peu nombreux sont de taille réduite. On observe quelques dictyosomes, et le réticulum endoplasmique est faiblement développé (PL.V - fig. 4). Ces caractéristiques cytologiques se retrouvent dans les cellules de la zone axiale de l'apex (PL.V - fig. 3). Il semble cependant que les mitochondries soient plus nombreuses, et que des gouttelettes osmiophiles de taille variable apparaissent dans le cytoplasme. Bien que de forme plus allongée, les cellules des zones latérales (anneau initial selon PLANTEFOL, 1962) ont une ultra-structure comparable à celle des cellules des assises superficielles.

b) Cellules de méristèmes parasités :

Selon EVANS et WILSON (1971), le mycélium dicaryotique d'<u>Ustilago violacea</u> réside dans le phloème, juste en dessous du méristème apical, lorsqu'il vit en parasite dans Silene vulgaris.

Dans le cas de <u>Silene dioica</u>, il s'installe entre les cellules méristématiques et peut être observé dès la première couche cellulaire de l'apex qu'il envahit entièrement (PL.VI - fig. 5). Dans certains cas, il est en relation directe avec l'extérieur, ce qui suggère son mode de pénétration dans l'hôte (PL.V - fig. I).

Le mycélium dicaryotique est entouré d'une paroi épaisse et se localise dans la lamelle moyenne comme cela a été décrit dans les tissus sporogènes de Silene dioica (AUDRAN et BATCHO, I980). Les hyphes mycéliens progressent alors de préférence à l'emplacement de méats qu'ils créent en écartant les cellules voisines (PL.VI - fig. 6), mais ils peuvent aussi être situés entre les parois d'une arête cellulaire séparant deux cellules voisines (PL.VII - fig. 7). On le retrouve partout dans l'apex (PL.VI - fig. 6 et PL.VII - fig. 8); par contre, il est rare dans les ébauches foliaires, et presque inexistant dans les feuilles différenciées (fig. I2).

Malgré la présence du parasite, les cellules méristématiques ont une infrastructure presque normale, si ce n'est la présence parfois de gouttelettes osmiophiles plus abondantes, qui peuvent participer à la nutrition du champignon (BATCHO et AUDRAN, 1979) (PL.VI - fig. 5). Certaines de ces cellules se divisent d'ailleurs normalement (PL.VI - fig. 6).

c) Faisceaux criblo-vasculaires et méristèmes axillaires :

Lorsque <u>Verticillium dahliae</u> parasite le chrysanthème ornemental, au bout de huit jours, des hyphes et des conidies apparaissent dans tout le système vasculaire des boutures. Les tubes criblés sont obturés, ce qui entraîne le flétrissement général de la plante (ALEXANDER et HALL, 1977).

Dans le cas de <u>Silene dioica</u> parasité par <u>Ustilago</u> <u>violacea</u>, le xylème et le phloème semblent dépourvus de parasite. Par contre, le mycélium est abondant au niveau des méristèmes axillaires qui, à l'aisselle de chaque feuille, produisent des rameaux. Ce qui explique que les fleurs que portent ces rameaux soient toutes parasitées quand l'infection est réalisée sur des plantules ou des rosettes de feuilles.

Dans la nature, nous avons observé des plantes dont certains rameaux portent des fleurs parasitées, alors que sur d'autres rameaux, les fleurs sont indemnes ; dans ce cas, il est vraisemblable que l'infection due à la pluie, au vent ou aux insectes, n'atteint que certains bourgeons axillaires (fig. I2).

En résumé, contrairement aux observations de WANG (1934) et, surtout, à celles de GIULIANO (1962) qui décrit le parcours du mycélium à travers les faisceaux cribro-vasculaires de <u>S. dioica</u> détruisant au passage tous les tissus traversés, nous avons constaté, aussi bien en M.O. qu'en M.E.T., que les hyphes du parasite sont toujours entre les cellules et non en contact direct avec le cytoplasme de l'hôte. De plus, les cellules voisines des mycéliums sont indemnes parce que le parasite est dépourvu d'agressivité avant la formation des organes reproducteurs.

Son absence dans les faisceaux cribro-vasculaires permet, à ces derniers, d'assurer normalement le transport des éléments nutritifs, ce qui explique pourquoi il est difficile de distinguer les plantes saines de celles qui sont parasitées et dont le développement végétatif est à peine troublé. Ce comportement est donc très différent de celui du tournesol parasité par Verticillium dahliae où le parasite provoque des modifications ultrastructurales des faisceaux cribro-vasculaires : il dégrade la paroi des vaisseaux et la nécrose apparaît en même temps que la dégénérescence du phloème (ROBB et coll., 1977).

Les observations en M.E.T. ont permis de préciser qu'Ustilago violacea se maintient entre les cellules des méristèmes apicaux et axillaires pendant toute la période végétative de Silene dioica.

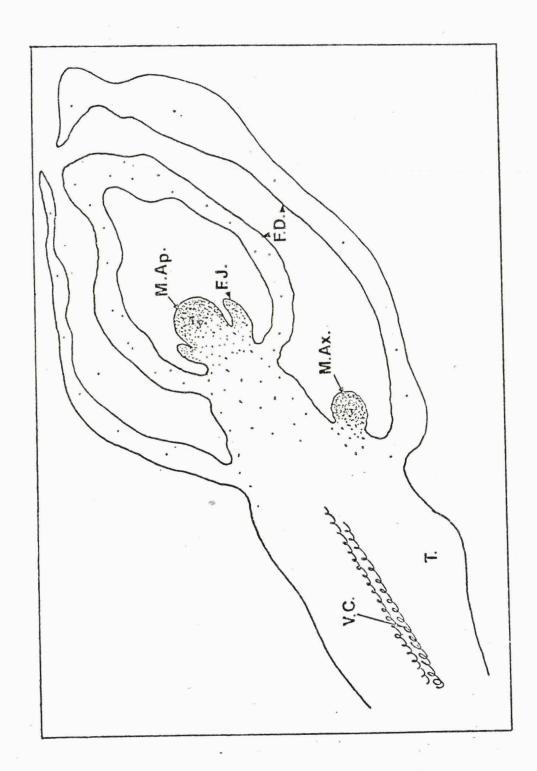


Fig. I2 : Localisation du mycélium d'Ustilago violacea dans l'apex de Silene dioica au stade végétatif,

La teneur en mycélium dans les différentes parties de l'apex est exprimée sous l'aspect de pointillés plus ou moins densément répartis.



Il peut y vivre pendant plusieurs années sans sporuler ni détruire les cellules méristématiques, contrairement à ce qui se passe en présence des cellules sporogènes (BATCHO, JEAN et BOURIOUET, 1930 : AUDRAN et BATCHO, 1979). Aussi, on comprend pourquoi les plantes artificiellement parasitées, et maintenues en serre depuis 6 ans, alors qu'elles perdent leurs tiges et se transforment en rosettes pendant l'hiver, présentent des fleurs charbonnées tous les étés. Il est probable, dans ce cas, que le mycélium d'Ustilago violacea subsiste dans les méristèmes médians des rosettes.

En ce qui concerne les plantes observées dans la nature, dont les feuilles et les tiges disparaissent en hiver, le parasite persisterait dans les centres méristématiques souterrains, susceptibles de redonner des tiges l'été suivant.

Enfin, le fait que le champignon soit absent dans les faisceaux cribro-vasculaires et, aussi, dans les tissus foliaires au fur et à mesure que les feuilles se différencient, laisse supposer que le mycélium dicaryotique d'<u>Ustilago violacea</u> peut avoir trois comportements différents selon qu'il est en présence de cellules différenciées, de cellules méristématiques, ou du tissu sporogène (AUDRAN et BATCHO, 1979). Dans le premier cas, le mycélium est réprimé et disparaît ; dans le second, il trouve les conditions de vie ralentie et ne sporule pas ; enfin, dans le troisième, il trouve un substrat favorable à sa sporulation.

La figure 12 résume cette localisation du parasite dans les tissus végétatifs de <u>Silene dioica</u>.

B - MODIFICATION DE LA MORPHOGENESE DES FLEURS MALES ET FEMELLES DE SILENE DIOICA SAINES ET PARASITEES PAR USTILAGO VIOLACEA.

Les boutons floraux provenant de pieds mâles et femelles de <u>Silene dioica</u> sont fixés au carnoy et colorés à la thionine. Le test de BRACHET a été choisi pour la mise en évidence des polysaccharides.

a) Développement de l'androcée et formation du pollen dans la fleur mâle saine :

L'androcée de Silene dioica comprend deux verticilles de cinq étamines (PL.VIII - fig. Ia et 2a), qui se développent l'un après l'autre. Dans les boutons floraux dont la taille est inférieure à I mm, seul le verticille interne est visible. les étamines sont à l'état de lobes méristématiques (PL.VIII fig. 3a). Chaque lobe est formé de cellules à gros noyau (PL.VIII - fig. 4a) dont le protoplasme est intensément coloré en rouge par le test de BRACHET, ce qui indique sa richesse en acides nucléiques. Lorsque le bouton atteint I,5 mm (PL.VIII - fig. 2a et 5a), les anthères complètement formées comprennent 4 sacs polliniques : elles sont au stade préméiotique. L'axe caulinaire, au centre du verticille interne d'étamines, se termine par une languette de tissu procambial (PL.VIIIfig. 6a), sans la moindre ébauche d'ovaire. La paroi du sac pollinique comprend les assises I)épidermique 2) sous-épidermique (qui donnera ultérieurement l'endothécium); 3) deux assises intermédiaires de cellules étroites (PL.VIII fig. 5a) constituant le "mur"; 4)1'assise des cellules tapétales, en voie de différenciation enveloppe, 5) le tissu sporogène. Les deux premiers types de cellules ont la même coloration : bleu foncé pour le noyau, rose pour le cytoplasme, ce qui souligne leur origine commune (l'archesporium) même si leur morphologie est différente.

Lorsque le bouton floral atteint 2,5 mm, les étamines du verticille interne ont une taille très supérieure à celles du verticille externe (PL.VIII - fig. 7a). Le tissu sporogène entre en mélose, mais celle-ci n'est pas rigoureusement synchrone dans tous les sacs polliniques : nous avons observé côte à côte des mélocytes en métaphase I et en prophase II.

A la fin de la mélose (PL.VIII- fig. 8a), le tapis, à son optimum de développement, est composé de cellules plurinucléées (2 à 3 noyaux) dont le cytoplasme est intensément coloré par la réaction métachromatique de la thionine; les assises intermédiaires sont très étroites et l'endothécium formé

de cellules allongées en voie de différenciation (PL.VIII- fig. 9a).

La sporogénèse se déroule quand les boutons floraux ont entre 3 et 4 mm. Après la mitose pollinique, une grande vacuole occupe plus de la moitié du volume cellulaire du jeune grain de pollen (PL.VIII- fig. 9a). Le sporoderme est alors entièrement formé; il comprend une lame d'endexine sur laquelle sont fixés les piliers de l'ectexine. Le tapis régresse, les assises intermédiaires ne sont plus visibles et celles de l'assise mécanique présentent les épaississements caractéristiques de leurs parois.

Les précisions ultrastructurales ont été apportées par les observations en M.E.T. Ainsi, les assises pariétales, au nombre de 3, sont constituées de cellules aplaties dont le noyau possède deux ou trois petits nucléoles denses. Dans le cytoplasme riche en ribosomes, on observe les organites habituels d'une cellule végétale. On remarquera toutefois le faible développement du réticulum endoplasmique et la présence d'un vacuome bien développé dont l'accroissement ultérieur est un des traits dominants de l'évolution normale de ces cellules (PL.IX - fig. 2).

Le massif sporogène, en position centrale, est constitué de cellules isodiamétriques. Leur composition infrastructurale est relativement simple (PL.IX - fig. 3). Les parois squelettiques, fines et sinueuses, ne sont traversées que par de rares plasmodesmes. Le hyaloplasme est riche en ribosomes; les plastes peu nombreux ont une forme subsphérique; leur stroma très dense renferme un système lamellaire vestigial réduit le plus souvent à de petites vésicules en position périphérique; le chondriome abondant est composé de mitochondries de forte taille et possédant de rares crêtes; les dictyosomes, d'infrastructure classique, ont une activité restreinte; le réticulum endoplasmique est extrêmement réduit et des vacuoles à caractères antophagiques sont reconnaissables. Enfin, le noyau de forte taille possède un gros nucléole central.

Ces cellules conservent cet aspect cytologique jusqu'à la nécrose. Toutefois, certaines cellules sporogènes, en particulier celles situées au centre du massif, se détruisent (PL.IX - fig. I). Leur cytoplasme, en se densifiant, réagit fortement aux colorants usuels de la M.O. et, plus particulièrement, à ceux des lipides. Le noyau n'est plus discernable.

Nous avons suivi particulièrement l'évolution des cellules tapétales à cause des troubles ultérieurs que provoque Ustilago violacea, spécialement à leur niveau.

A l'origine, l'assise tapétale est constituée de cellules uninucléées dont les pôles cellulaires tournés vers l'intérieur du sac pollinique, sont occupés par l'ensemble regroupé des mitochondries et des plastes, tandis qu'au pôle opposé, se tient le noyau. Cette disposition confère à ces cellules une certaine polarité.

C'est au début du stade méiotique que les cellules tapétales, perdant leur polarité, se divisent mitotiquement et deviennent binucléées. Au stade tétrade, leur taille augmente considérablement, leur cytoplasme est riche en ribosomes avec un appareil de golgi particulièrement actif et un réticulum endoplasmique très développé. Les cellules tapétales sont reliées entre elles par de nombreux plasmodesmes ; elles sont limitées par une paroi squelettique de structure fibrillaire et de nature polysaccharidique, dont l'épaisseur est plus importante sur les faces radiales. Des amas denses de substances de texture hétérogène se développent sur la face bordant la loge de l'anthère et dans le périplasme.

Au stade où les microspores sont libérées des tétrades, les parois squelettiques des cellules tapétales se détruisent. Ces dernières ne sont plus séparées les unes des autres et de la cavité sporangiale que par leurs plasmalemmes surmontés d'un fin feutrage polysaccharidique. Sur la face interne des

cellules tapétales se forment des orbicules de taille et de forme irrégulière, présentant une texture hétérogène. De nombreuses particules, de même densité que les orbicules, semblent fusionner dans le cytoplasme cellulaire.

De la fin de la période de vacuolisation des microspores à l'anthèse, les cellules tapétales se détruisent. Cette destruction est essentiellement marquée par une intense vésicularisation du cytoplasme et la genèse d'importantes flaques lipidiques, avec la formation de masses de substances homogènes. Ces dernières, émises dans la cavité sporangiale, viennent au contact des grains de pollen. A l'anthèse, le tapis, totalement écrasé, est associé aux restes de cellules transitoires, et forme une couche de débris cellulaires surmontée par les orbicules.

Chaque grain de pollen sphérique (PL.VIII- fig. IOa) a un diamètre de 50 à 60 µm; sa taille est donc plus élevée que celle signalée par M'NEIL et coll. (I978). Nous avons dénombré environ I5 % de grains vides (PL.VIII - fig. IIa), réduits au sporoderme. Ce pourcentage de léthalité accidentelle est toutefois normal.

Le développement de l'androcée de <u>Silene dioica</u> se réalise donc de façon classique (VASIL, I973; JEAN, I974). Soulignons toutefois que le tapis dérive de l'assise externe du tissu sporogène et qu'il n'y a aucune structure ovarienne dans les fleurs mâles.

b) Développement et morphologie de la fleur mâle parasitée :

Extérieurement, un bouton floral parasité ne se distingue pas d'un bouton sain (PL.X - fig. 2). Les anthères parasitées sont légèrement plus courtes, mais leur morphologie n'est pas modifiée (PL.X - fig. 2 et 4).

Dans les très jeunes boutons, les lobes méristématiques des futures étamines se développent normalement, sans trace

apparente du parasite. Lorsque l'anthère est formée (PL.XI - fig. Ib et 2b), la paroi des quatre sacs polliniques est constituée de cellules, toutes identiques, qui se colorent fortement par la réaction métachromatique : celle-ci traduit l'influence d'Ustilago violacea sur le métabolisme cellulaire.

Quand le bouton atteint de 2,5 à 3 mm, le tissu sporogène, formé par un parenchyme homogène, n'a pratiquement pas évolué ; son développement est bloqué par la présence du parasite. Celui-ci peut apparaître dans l'assise périphérique des cellules sporogènes et progresser vers les cellules centrales (PL.XI - fig. 3b) ou inversement. Les cellules s'hypertrophient avec un noyau qui double de taille (I6 µm), rejeté ultérieurement à la périphérie de la cellule par de grandes vacuoles qui traduisent le déséquilibre hydrique des cellules (PL.XI - fig. 8b et 9b); dans ce cas, les structures cellulaires sont testées par la coloration de BRACHET. Quand les boutons ont atteint 4 mm, la sporulation du champignon commence à se manifester les cellules du tissu sporogène sont détruites (PL.XI - fig. 4b et 5b) et remplacées par de jeunes téliospores (PL.XI - fig. 6b et 7b) colorées en violet pourpre par la thionine. En même temps, le mycélium progresse dans les cellules de la paroi du sac pollinique.

En M.E.T., cinq étapes peuvent être définies dans la progression des modifications histologiques des anthères aboutissant à leur destruction.

c) Apparition du mycélium dans les tissus de l'anthère :

Cette première étape, où le champignon s'implante dans l'anthère, est particulièrement difficile à détecter en M.O. Cette difficulté est liée à la finesse des structures mycéliennes qui échappent ainsi à l'observation, mais surtout, au fait que l'anthère conserve une histologie apparemment normale (PL.XII - fig. 4). Les observations en M.E.T. révèlent cependant, sans ambiguité, que le champignon apparaît très tôt dans les

tissus de l'anthère qu'il envahit progressivement. On le rencontre aussi bien dans les tissus pariétaux (PL.XII - fig.5) qu'au niveau du tissu sporogène (PL.XII - fig. 6). Le mycélium, comportant une fine paroi dense, est alors essentiellement localisé aux angles des cellules. La structure cytologique des cellules sporogènes et pariétales ne semble pas affectée par la présence du parasite, si ce n'est un léger épaississement de leurs parois squelettiques au contact des parois du champignon (PL.XII - fig. 5 et 7).

d) Nécrose ponctuelle au sein du massif sporogène :

Alors que les cellules pariétales conservent un aspect normal, quelques cellules sporogènes situées à différents endroits du massif sporogène se nécrosent et se résolvent en masses denses fortement chromatiques et facilement repérables en M.O. (PL.XIII - fig. 8). La M.E.T. permet de suivre les modalités de la dégradation de ces cellules : au début, la masse cytoplasmique se condense et se sépare de la paroi squelettique. Les mitochondries et les plastes se vésiculisent, tandis que de nombreuses gouttelettes ou amas lipidiques sont rejetés dans le périplasme. Le noyau conserve un aspect normal (PL.XIII - fig. 9). Puis, la densification et la vésicularisation du cytoplasme s'accentuant, le novau se détruit à son tour. De nombreux systèmes vésiculaires de taille très diverse, groupés en amas ou isolés, s'observent alors dans la masse densifiée du cytoplasme (PL.XIII - fig. 10). Enfin, a l'issue de cette dégradation cellulaire, il ne reste plus qu'une masse très dense, limitée par des restes de parois squelettiques (PL.XIII - fig. II). Dans le périplasme, noyé dans une substance granulo-fibrillaire, subsistent quelques vésicules. Complétons ces données en soulignant : la présence quasi constante d'un hyphe mycélien au contact de la cellule sporogène en nécrose (PL.XIII - fig. 9 et II) et l'existence de cellules sporogènes nécrosées au voisinage de cellules sporogènes en mitose (PL.XIII - fig. IO).

e) Extension du phénomène nécrotique à l'ensemble du massif sporogène :

Le nombre des cellules sporogènes nécrotiques augmente et l'aspect histologique du sac pollinique se modifie progressivement.

- I) Ce sont tout d'abord les cellules sporogènes au contact des cellules nécrosées qui se détruisent. Il se constitue ainsi des amas denses de taille plus importante qui s'insinuent entre les cellules sporogènes non encore atteintes, et tendent à les séparer les unes des autres (PL.XIV - fig. I2). La destruction de ces cellules se déroule selon le même processus que celui décrit précédemment. Parallèlement, les cellules intactes augmentent légèrement leur volume (PL.XIV - fig. I2) et de nombreuses petites vacuoles apparaissent dans le cytoplasme dont la densité ribosomale a légèrement diminué (PL.XV - fig. I5). On constate qu'un grand nombre de mitochondries ont un stroma tres éclairci et de tres rares crêtes (PL.XIV - fig. I3). Le noyau et le reste des organites cellulaires ne semblent pas modifiés. Ces cellules sont toujours limitées par leur fine paroi squelettique et leur zone de contact avec les amas de cellules nécrosées ne présente pas de particularités (PL.XV - fig. 15 et I6). Les cellules pariétales ne sont pas affectées par cette lyse cellulaire, bien que de nombreux hyphes mycéliens soient à leur voisinage (PL.XIV - fig. 14).
- 2) Initialement isolés, les amas de cellules nécrosées, en augmentant d'ampleur se rejoignent. Ils englobent ainsi les massifs de cellules sporogènes hypertrophiées (PL.XVI fig. I7). Dans ces cellules fortement vacuolisées, le cytoplasme apparaît dilué. Ouelques images (PL.XVII fig. 20) suggèrent, par ailleurs, que la dilatation de certains canalicules du R.E., par ailleurs fortement vésiculaire, contribue à l'enrichissement vacuolaire de la cellule. Les plastes conservent leur apparence initiale avec un stroma dense, ainsi que les mitochondries (PL.XVI fig. I8 et PL.XVIII fig. 25 et 26). C'est à ce stade que nous avons observé, dans un seul cas. à partir des hyphes mycéliens plus abondants que précédemment, l'émission d'une

petite projection pénétrant dans une cellule sporogène. A son niveau, la paroi du champignon n'est séparée du plasmalemme de la cellule hôte que par un mince espace clair (PL.XVI - fig. 19).

Au paroxysme de cette hypertrophie cellulaire, le noyau devient picnotique; les membranes nucléaires se déforment; l'espace périnucléaire se boursoufle; tandis que la chromatine se condense et que le nucléole perd de sa compacité en s'homogénéisant (PL.XVII - fig. 20 à 23).

Puis, le contenu cellulaire se rétracte (PL.XVIII - fig. 24). En se densifiant, le cytoplasme exsude dans l'espace situé entre le plasmalemme et la paroi squelettique, une substance spumeuse renfermant des globules ou amas lipidiques et de nombreux systèmes vésiculaires (PL.XVII - fig. 23). A l'issue de cette dégradation, le protoplasme toujours encadré par sa paroi squelettique, constitue une masse dense uniforme où il est difficile de reconnaître quelques organites cellulaires (PL.XVIII - fig. 26).

f) Invasion de la cavité sporangiale par les hyphes mycéliens :

Lorsque la grande majorité des cellules du massif sporogène est transformée en masse dense, les hyphes mycéliens proliférant fortement et s'insinuant entre les restes cellulaires, prennent possession de la cavité sporangiale (PL.XIX - fig. 27 - 28). Ces hyphes, comportant toujours une paroi fine et dense, sont maintenant en contact étroit avec les protoplasmes dégénérés (PL.XIX - fig. 29).

g) Sporulation:

Des hyphes mycéliens sont aussi observés dans le filet, entre les cellules de ce dernier. Ceux-ci sont généralement orientés parallèlement au grand axe du filet et peuvent ainsi être sains sur de grandes longueurs, permettant de reconnaître quelques aspects de leur structure cytologique. L'hyphe mycélien est composé de cellules binucléées (PL.XX - fig. 32), mesurant

en moyenne 4 à 5 µm; elles possèdent une fine paroi dense, contrastant fortement avec celle des cellules parenchymateuses de l'hôte. Les parois transversales sont plus épaisses que les latérales (PL.XX - fig. 33). Dans le cytoplasme riche en ribosomes, on observe de nombreuses petites vacuoles à contenu granulofibrillaire, des gouttelettes lipidiques, ainsi que de nombreuses mitochondries (PL.XX - fig. 33, 34). Les noyaux enveloppés par leur double membrane ont un contenu d'apparence homogène (PL.XX - fig. 32). Remarquons que les cellules du filet ne semblent pas affectées par la présence du mycélium.

h) Libération des téliospores :

La destruction de l'assise épidermique permet la libération des téliospores avant l'épanouissement des boutons floraux. Cette libération n'est pas due à une déhiscence de l'anthère puisqu'il n'y a pas d'assise mécanique. En fait, pendant la sporulation, <u>Ustilago</u> progresse activement à l'emplacement des grains de pollen, sous sa forme mycélienne, entre les cellules des assises intermédiaires. La présence du champignon ayant inhibé la différenciation des cellules du tapis, le massif sporogène, contrairement à ce qui est observé au niveau des anthères saines, est homogène du centre à la périphérie. Il est directement bordé par des assises cellulaires toutes semblables et de structure parenchymateuse, puisque même l'endothécium, future assise mécanique, ne se différencie pas.

Après avoir détruit et digéré les cellules sporogènes, <u>Ustilago</u> s'attaque aux assises intermédiaires dont les cellules, entourées par un mycélium dicaryotique très épais et virulent, se nécrosent progressivement, de façon à ce que les téliospores mûrissent avant que la destruction n'atteigne l'épiderme qui est la dernière harrière qui s'oppose à leur libération.

A ce stade, l'anthère remplie de téliospores prend une teinte violacée (PL.X - fig. 3), et le moindre mouvement extérieur est susceptible de provoquer une rupture au niveau de l'épiderme. Soulignons enfin que tout au long de cette évolution, la morphologie externe de l'anthère parasitée est très peu différente de celle de l'anthère saine (PL.X - fig. 3 et 4), tout au moins jusqu'à la dernière phase de la destruction.

En résumé, les jeunes anthères de <u>Silene dioica</u>, depuis le moment de leur initiation jusqu'à la nécrose, ont une composition histologique comparable à celle de jeunes anthères de <u>Stellaria media</u> (PAL., 1952) et, d'une façon générale, à celle décrite habituellement chez les Angiospermes (MAHESHWARI, 1950; BHOJWANI et BHATNAGAR, 1977),

Les cellules des assises pariétales ont une infrastructure identique à celle de cellules parenchymateuses; Si
la couche cellulaire sous-jacente à l'épiderme se transforme
en assise mécanique, les autres couches plus internes sont
appelées à se détruire après s'être fortement yacuolisées
(AUDRAN, 1977a).Les cellules du massif sporogène ont les
caractéristiques de cellules actives et leur caractère cytologique
s'accorde à celui décrit chez des cellules sporogènes de plantes
supérieures (AUDRAN, 1977b; GENEVES, 1971; LODKINA et coll.,
1975; CHRISTENSEN et coll., 1972; HESLOP-HARRISON, 1966).

Nous avons pu constater que, dans un certain nombre d'anthères, des cellules sporogènes se nécrosent et disparaissent. Rien, dans leur comportement cytologique, ne permet de reconnaître ces cellules avant leur destruction brutale. Il semble donc qu'il existe, au sein du massif sporogène, et bien que toutes les cellules qui le constituent aient une origine commune, deux populations cellulaires distinctes; l'une dont le développement normal aboutit à la genèse des grains de pollen; l'autre vouée à une mort prématurée, phénomène sans doute lié à la nutrition des cellules sporogènes normales. Des faits très proches ont été rapportés dans les sacs polliniques des Gymnospermes (AUDRAN, 1977b) et les anthères des Angiospermes (MAHESHWARI, 1950).

Ainsi, dans les anthères d'Ophiopogon (MAHESHWARI, 1934), d'Holoptelea (CAPOOR, 1937), de Zostera (ROSENBERG, 1901) et de Kigelia (VENKATASUBBAN, 1945), de nombreuses cellules sporogènes ne se différencient pas en cellule-mères polliniques. Devenues stériles, elles sont écrasées et absorbées par les cellules sporogènes fonctionnelles. Aussi, bien que toutes les cellules sporogènes soient théoriquement capables de donner des microspores, certaines servent à la nutrition des autres. Dans le cas extrême des anthères de Gentianacées (GUERIN, 1926) dépourvues d'un tapis bien constitué, les fonctions de nutrition de ce dernier sont normalement assurées par les cellules sporogènes elles-mêmes. La destruction des cellules sporogènes est caractérisée par l'apparition, à leur niveau, d'une forte lipochromie. Des observations, faites en M.E.T. sur des cas similaires, (AUDRAN, 1977b) révèlent que le caractère lipophile des cellules sporogènes en dégradation est dû à une lipophanérose résultant de la lyse des organites cellulaires.

Diverses hypothèses ont été proposées pour tenter d'expliquer la dégénérescence de ces cellules sporogènes. Certaines font appel à une destruction mécanique, d'autres à une nécrose liée à une déficience trophique de la cellule (BAIRD, 1939). Toutefois, ces mécanismes ne semblent pas être la cause première de ces destructions cellulaires, mais ne feraient qu'extérioriser un état latent probablement dû à une particularité génétique (AUDRAN, 1977b).

CONCLUSION

I - LE MYCELIUM.

Peu d'auteurs ont analysé, à l'échelle de la M.E.T., la cytologie du mycélium du genre <u>Ustilago</u> (ROBB, I972). Les résultats que nous avons recueillis chez <u>Ustilago</u> <u>violacea</u> n'offrent pas de particularités, si ce n'est l'abondance du système vacuolaire des cellules mycéliennes. Leur cytologic est comparable à celle décrite généralement chez d'autres champignons (MARCHANT, I970; BELLEMERE, 1978).

Selon WANG (1932), les filaments mycéliens circulent, soit dans les espaces intercellulaires, soit dans les cellules elles-mêmes, où, pénétrant dans le protoplasme, ils peuvent venir entourer le noyau et parfois y pénétrer. Si nos observations confirment les déplacements intercellulaires du mycélium, nous n'avons, par contre, jamais observé d'hyphes intracellulaires.

Dans les anthères parasitées, le mycélium dicaryotique circule entre les cellules et spécialement, au niveau des angles cellulaires, là où , normalement, se situent les méats. Comme pour le mycélium de Taphrina deformans, parasite des feuilles du Pêcher (SCHNEIDER et DARGENT, 1977), celui d'Ustilago violacea se trouve toujours en dehors des parois cellulosiques. Il progresse dans la lamelle moyenne et son passage provoque un écartement des cellules, en particulier, dans le tissu sporogène où les méats sont absents du fait de la contiguité des cellules. Il est probable, comme cela se déroule dans les tissus racinaires de la Tomate pour Pirenocheta lycopersici, que la pénétration intracellulaire du mycélium soit la résultante d'une double action enzymatique et mécanique (DELON, 1974). Tandis que des systèmes lytiques digèrent la lamelle moyenne, la turgescence du mycélium écarte localement les cellules.

Les champignons parasites des Végétaux, dont le mycélium est intercellulaire, émettent souvent des haustoria ou suçoirs, leur permettant de capter les produits du métabolisme des organes infestés (ALEXOPOULOS, 1958); BOUCHET, 1979). Sur le mycélium d'Ustilago violacea, WANG (1934) a signalé, de place en place, la présence de suçoirs de formes variées, le plus souvent globuleux, piriformes, parfois irréguliers, rarement découpés en lobes ou ramifiés. Ces suçoirs entrent dans la cellule généralement par simple effraction quelquefois par évagination. Pour notre part, nous n'avons observé qu'un cas où le mycélium projette, dans une cellule sporogène, une émergence pouvant s'apparenter à un suçoir. Cette formation peu développée s'enfonce dans le protoplasme de la cellule-hôte, en invaginant la paroi squelettique. A l'extrémité de l'invagination, la paroi squelettique se rompt et la paroi mycélienne n^{-r}est séparée du plasmalemme de la cellule sporogène, que par un espace fin et transparent.

A cet endroit, le plasmalemme de la cellule-hôte ne semble pas modifié et le cytoplasme environnant l'invagination ne présente pas d'organisation structurale particulière, ni de rassemblement d'organites cellulaires. Ce type de suçoir se révèle donc très simple et apparaît comme un diverticule mycélien, sans différenciation particulière, comme le sont ceux des hyphes associés aux Cyanophytes dans le Lichen Lichina pygmea (BOISSIERE, 1977). De ce fait, ces suçoirs sont très différents de ceux, plus complexes dans leur infrastructure et leur rapport avec la cellule-hôte, décrits chez de nombreux champignons (HOHL, STOSSEL, 1976; ORCIVAL, 1969).

2 - MODALITES D'ACTION DU CHAMPIGNON SUR LES TISSUS DE L'ANTHERE.

Les techniques de la M.E.T. ont montré sans ambiguité que les hyphes mycéliens, provenant du filet de l'étamine, envahissent très tôt les différents tissus de l'anthère. La finesse du mycélium et l'absence d'altération des tissus parasités expliquent, sans doute, pourquoi ce premier stade de l'infestation a échappé aux observations en M.O.

Installé, le champignon :

- bloque l'histogenèse de l'anthère à un stade juvénile :

En effet, les cellules, dont la vocation normale est de produire les microspores, demeurent en l'état de cellules sporogènes. Le tapis ne se différencie pas, et la méiose n'a pas lieu. Par ailleurs, l'endothécium ne se forme pas.

- détruit sélectivement le contenu de l'anthère :

Les cellules sporogènes sont, en effet, les seules à être affectées par le parasite et à se nécroser. Les cellules pariétales ne semblent pas, par contre, souffrir du champignon.

Ainsi, en maintenant les anthères dans un état de jeunesse et en altérant spécifiquement le massif sporogène,

le champignon se développe au sein de systèmes cellulaires très actifs et bénéficie de leur métabolisme intense. Ce fait peut être mis en relation avec le rajeunissement cellulaire (DELON, 1974) et l'augmentation de l'activité métabolique (WOOD, 1967), notés dans les régions infestées des plantes parasitées par les champignons.

Deux aspects particuliers caractérisent l'action du champignon sur les cellules sporogènes :

tout d'abord, celle-ci ne se manifeste pas dès l'entrée du champignon dans l'anthère. La virulence du champignon est en effet, précédée d'une période de latence qui correspond à son installation entre les cellules du massif sporogène. Selon WANG (1934), il en serait de même pour de nombreuses Ustilaginales dont le mycélium implanté dans les tissus de la plante nourricière, n'empêche pas les cellules de conserver leurs constituants à l'état normal pendant un temps plus ou moins long. Il est probable que le mycélium a besoin, pour affecter les cellules, d'avoir atteint, soit une certaine importance volumétrique (effet masse), soit un certain degré de maturité (synthèse enzymatique).

par ailleurs, l-raction du champignon se manifeste à distance. La faible fréquence des suçoirs rencontrés semble montrer que les effets destructeurs du champignon s-reffectuent à travers les parois squelettiques du champignon et de la cellule-hôte, par émission de systèmes enzymatiques fongiques ou de toxines, comme cela se réalise pour de nombreux champignons (BYRDE et coll., 1973).

3) modifications pathologiques des cellules-hôtes.

De nos résultats, il ressort que le mycélium provoque, dans un premier temps, l'épaississement, à son contact, de la paroi squelettique de la cellule-hôte, et, dans un deuxième temps, sa destruction.

Modification pariétale :

Au contact du mycélium, la paroi sporocytaire primaire augmente légèrement d'épaisseur, constituant ainsi autour des hyphes, des sortes de fourreaux. Cette réaction peut être considérée comme un état caractéristique de défense de la cellule-hôte vivante. L'épaississement pariétal, relativement simple dans sa composition, est, comme la paroi squelettique de la cellule-hôte, de nature pecto-cellulosique (BATCHO et AUDRAN, 1979). Cette zone de confrontation entre la cellule-hôte et le parasite constitue l'interface (BRACKER, 1968), et le rôle de cette région dans les interactions hôte parasites a été décrit en détail par ALBERSHEIM et coll. (1969). Selon ces derniers auteurs, la paroi de la cellule-hôte déterminerait la possibilité pour l'organisme pathogène de produire les enzymes nécessaires à son action, BRACKER et LITTLEFIELD (1973), dans une mise au point de cette question, distinguent 40 types d'interfaces réparties en 6 groupes. Les relations pariétales Ustilago violacea-Silene dioica peuvent se ranger dans le 2ème groupe, et seraient du type ITII. Cette interface paroi-cellulehôte-et-cellule-fongique doit être considérée comme de nature éminemment dynamique et variable (DELON, 1974), et il est probable que c'est à son niveau que s'établit l'essentiel des échanges de métabolites entre l'hôte et le champignon. Par ailleurs, les parois sporocytaires primaires conservent, durant la destruction des cellules sporogènes, une composition infrastructurale quasi normale, bien que leur réactivité aux tests des polysaccharides diminue progressivement (BATCHO et AUDRAN, 1979). Cette absence d'altérations physiques de la paroi squelettique, en particulier au voisinage du filament mycélien, semble indiquer qu'Ustilago violacea est dépourvu d'enzymes dégradant les glucides de structures, bien que ceux-ci, selon ALBERSHEIM et coll. (1969) soient universellement produits par l'agent phytopathogène. La localisation d'Ustilago violacea essentiellement à l'extérieur des cellules de l'hôte, et l'absence apparente d'hydrolyse des parois sporocytaires primaires posent la question de son mode de nutrition. En raison de leur disposition, les hyphes sont toujours séparés du protoplasme de l'hôte par les parois

squelettiques, ce qui implique que le champignon puisse disposer de métabolites capables de traverser les parois squelettiques des cellules-hôtes. Des substances de nature hormonale émises par le champignon rendent sans doute possible de telles migrations, comme cela est envisagé chez <u>Taphrina deformans</u> (SCHNEIDER et DARGENT, 1977).

Destruction des cellules sporogènes :

Comme l'a souligné WANG (1934), les cellules sporogènes se nécrosent et constituent des amas denses, très chromophiles, entre lesquels se développe, puis sporule le champignon. Nous sommes donc en présence d'un parasite que l'on peut qualifier de nécrotrophe (LEWIS, 1975), qui utilise pour subvenir à ses besoins, les métabolites issus de la lyse du protoplasme de son hôte (BATCHO et AUDRAN, 1979).

Deux modalités différentes de destruction cellulaire qui se succèdent aussi dans le temps, ont été reconnues : •

Nécrose sans hypertrophie cellulaire :

Un nombre restreint seulement de cellules sporogènes est affecté par ce type de destruction qui est passé inaperçu en M.O. Ces nécroses ponctuelles sont, sans doute, à rattacher au caractère hétérogène de la population cellulaire composant le massif sporogène. Ainsi, seules les cellules vouées, dès leur origine, à disparaître seraient affectées par la présence du parasite. Ce dernier ne ferait qu'accélérer la manifestation de leur caractère morbide latent. A l'appui de cela, soulignons, d'une part, la présence de cellules sporogènes en mitose cotoyant les cellules en cours de dégradation et, d'autre part, que ces cellules se détruisent de la même manière que certaines de celles qui sont situées dans les anthères saines (AUDRAN, 1977b).

Nécrose avec hypertrophie cellulaire :

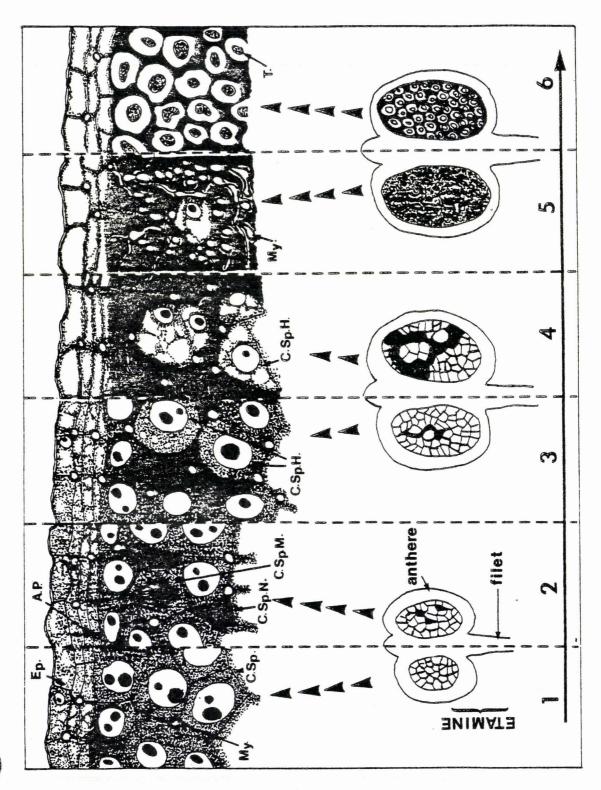
C'est ce type de destruction cellulaire, abondamment représenté dans l'anthère, qui a été décrit en détail par WANG (1932-1934).

La destruction de la cellule-hôte est alors précédée d'un fort accroissement volumétrique en relation étroite avec une intense vacuolisation du cytoplasme. Une part importante de ce vacuome dérive d'ailleurs de la dilatation in situ des travées du R.E. (MESQUITA, 1969). Parallèlement à l'hypertrophie cellulaire, le cytoplasme s'éclaircit, la teneur en ribosomes diminue, les mitochondries se dilatent. Des faits comparables ont été observés dans les cellules du tissu nourricier de la galle de Geocrypta galii sur Galium mollugo (ROHFRITSCH, 1971). L'hypertrophie cellulaire apparaît comme une réaction à la présence du parasite. Il est toutefois impossible de préciser si ce dernier agit directement, par son contact, ou indirectement en modifiant l'environnement cellulaire. Des observations faites sur l-hypertrophie cellulaire ont montré que celle-ci pouvait être déclenchée par de nombreux facteurs comme l'acide indolacétique, les carences minérales ou une atmosphère confinée (in GAUTHERET, 1959).

Quoiqu-'il en soit, cette hypertrophie traduit un déséquilibre certain du métabolisme cellulaire qui se marque par une pénétration importante d'eau. La cellule a alors, à l'échelle infrastructurale, l'aspect délavé des structures cellulaires fixées en milieu hypotonique (FINERAN, 1970). La cellule est devenue hyperhydrique (DE ROPP, 1947), et son infrastructure est proche de celle des cellules racinaires d'ectomycorrhize à Ascomycètes de <u>Pseudotsuga menziesii</u> (STRULLU, 1974).

La destruction picnotique du noyau précède le ratatinement de la cellule sporogène.

L'existence de dégénérescence ou de digestion intracellulaire est connue chez les plantes depuis longtemps (POUX, I963). Les données conjuguées de la M.E.T. et de la biochimie ont révélé l'intervention, dans ces processus lytiques, de structures cytoplasmiques particulières riches en hydrolases : les lysosomes (BUVAT, I97I). Les lysosomes seraient aussi à l'origine des nécroses cellulaires au sein des plantes parasitées





- Figure I3 : Représentation semi-schématique des différentes phases de la destruction du massif sporogène des anthères de <u>Silene dioica</u> (L.) Clairv. parasitées par Ustilago violacea (PERS.) Rouss.
 - I) apparition du mycélium dans les tissus de l'anthère;
 - 2) nécrose ponctuelle au sein du massif sporogène ;
 - 3-4) extension du phénomène nécrotique à l'ensemble du massif sporogène;
 - 5) invasion de la cavité sporangiale par les hyphes mycéliens ;
 - 6) sporulation.

A.P.: assises pariétales; C.Sp.: cellule sporogène; C.Sp.H.: cellule sporogène hypertrophiée; C.Sp.M.: cellule sporogène en mitose; C.Sp.N.: cellule sporogène en nécrose; Ep.: épiderme; My.: mycélium; T.: téliospore.

(MATILE, 1975). PITT et COOMBES (1968) ont, en effet, montré chez la pomme de terre infestée par Phytophtora erythroseptica que les lysosomes des cellules-hôtes, après rupture de leur membrane limitante, libéraient dans le cytoplasme leurs hydrolases; cette libération aboutissant à la lyse globale de la cellule. Au cours des processus nécrotiques des cellules sporogènes de S.dioica parasitée par U.violacea, nous n'avons pu, avec les techniques employées, détecter de structure lysosomale. Une étude enzymologique devrait permettre de combler cette lacune.

On notera toutefois que la lyse affecte l'ensemble de la cellule-hôte, et ne se cantonne pas à certaines régions cellulaires comme cela se déroule normalement dans les processus d'autophagie cellulaire (COULOMB, 1972). Ce type de nécrose cellulaire se rapproche, par son déroulement, des phénomènes lytiques décrits lors de la sénescence des cellules de racine de Zea mays (GAHAN, 1973).

L'essentiel de cette évolution du parasite dans les anthères de son hôte se trouve résumé par la figure I3.

C - <u>DEVELOPPEMENT ET MORPHOLOGIE DE LA FLEUR FEMELLE SAINE</u> ET PARASITEE.

L'une des actions spectaculaires d'<u>Ustilago violacea</u> dans les silènes est caractérisée par l'apparition des anthères dans les fleurs femelles qui, normalement, en sont dépourvues. Ainsi, sous l'action du parasite, les pieds femelles de <u>Silene dioica</u> acquièrent une morphologie hermaphrodite (PL.X - fig. I). Nous avons suivi, à l'aide de la M.O. et de la M.E.T., le développement de la fleur femelle saine et parasitée.

a) Boutons floraux sains :

Les boutons floraux femelles de I à I,5 mm sont plus effilés que les boutons mâles. A ce stade, il n'y a pas de différence morphologique entre les boutons sains et parasités. Ce n'est que peu avant l'ouverture des fleurs que ceux qui sont

parasités, apparaissent moins globuleux par suite de l'atrophie de l'ovaire.

Dans les très jeunes boutons femelles, on distingue aussi deux verticilles de 5 étamines (PL.XXI - fig. 'Ic), réduites à l'état de lobes méristématiques. Les fleurs femelles ont donc, à l'origine, des potentialités hermaphrodites. Normalement, les ovaires évoluent tandis que les lobes staminaux régressent (PL.XXI - fig. 2c).

b) Les ovules sains :

Les ovaires de 2 mm de long sur I mm de diamètre renferment déjà des ovules observables à la loupe binoculaire. Ces ovaires, à la fin de leur développement, peuvent atteindre 2 cm de long sur I,3 cm de diamètre, et contiennent plus de 300 ovules. Un ovule normal est constitué de deux téguments, l'un externe (PL.XXII - fig. I) et l'autre interne (PL.XXII - fig. I), généralement formés de deux assises cellulaires chacun. Sur le plan ultrastructural, les cellules tégumentaires ont les caractéristiques des cellules pariétales. Elles sont aplaties, comportant une paroi pectocellulosique épaisse, un cytoplasme fortement vacuolisé, de nombreux plastes et un noyau souvent pourvu de plusieurs nucléoles.

Les jeunes ovules sont dépourvus de téguments.

Néanmoins, ces derniers sont entièrement constitués autour du nucelle avant la formation du sac embryonnaire. Les cellules du nucelle sont semblables à celles décrites par AUDRAN et

BATCHO (1979) dans les tissus non différenciés des jeunes sacs polliniques; leurs caractères sont : un important noyau, un gros nucléole, un cytoplasme riche en ribosomes, en plastes, et mitochondries de petite taille et pauvres en crêtes; des vacuoles de taille variable, une fine paroi cellulosique ménageant de rares méats intercellulaires (PL.XXII - fig. 2).

c) Boutons floraux parasités :

En présence du parasite, les lobes staminaux se développent (PL.X - fig. I) (PL.XXI - fig. 3c et 4c). L'évolution des étamines et du parasite est comparable à celle observée dans les fleurs mâles parasitées. Le développement s'arrête au stade du tissu sporogène (PL.XXI - fig. 5c) par nécrose des cellules (PL.XXI - fig. 9c et IOc), sporulation du parasite (PL.XXI - fig. 8c) et destruction de la paroi de l'anthère (PL.XXI - fig. 7c). La présence du champignon ne modifie pas la paroi des cellules du réceptacle floral, ni celles du filet (PLXXI - fig. II) de l'anthère.

L'évolution de l'ovaire parasité s'arrête au stade d'archesporium pluricellulaire (PL.XXI - fig. 6c) sans atteindre une taille normale. Les observations en M.O. ont révélé la présence du mycélium dicaryotique dans les ovules, juste au niveau des cellules reproductrices (PL.XXI - fig. I2c et I3c). Afin d'apporter plus de précision sur l'action du parasite dans les fleurs femelles, nous avons analysé successivement les jeunes ovules parasités, la sporulation du parasite et, enfin, le cas des ovules dégénérés.

d) Ovules parasités :

Un ovaire parasité mesure en moyenne 0,5 cm de long sur 3 mm de diamètre, à la fin de son développement. Il est ainsi environ I6 fois plus petit que l'ovaire sain. Du reste, il évolue longtemps après l'ouverture des fleurs, alors que les anthères sont totalement détruites.

Au niveau des jeunes ovules, le nucelle est entièrement parasité par <u>Ustilago violacea</u> avant la formation des téguments (PL.XXIII- fig. 3 et 4). Le mycélium dicaryotique circule dans les composés pectiques de la lamelle moyenne et, surtout, à l'emplacement des méats (PL.XXIII- fig. 4); il arrive qu'il s'évagine à travers la paroi de certaines cellules et, dans ce cas, il est toujours limité par le plasmalemme qui l'empêche d'être directement en contact avec le cytoplasme.

Dans un premier temps, les cytostructures des cellules superficielles sont apparemment normales malgré le voisinage immédiat du parasite (PL.XXIV - fig. 5). Au centre du nucelle, le mycélium se révèle plus abondant (PL.XXV - fig. 6). Les cellules sont de plus en plus vacuolisées avec des autophagosomes où se détruit une partie du cytoplasme (PL.XXY - fig. 6). Les premières cellules altérées par <u>Ustilago</u> sont celles situées au centre du nucelle, à l'emplacement du sac embryonnaire. Lorsque le mycélium s'évagine à travers la paroi, les inclusions cytoplasmiques sont absentes le long du plasmalemme bordant le suçoir (PL.XXVI - fig. 7).

Dans certains cas, il se forme entre le plasmalemme et la paroi mycélienne, une poche renfermant des vésicules et des débris membranaires.

La destruction des cellules-hôtes se réalise de deux manières :

- I) le cytoplasme devient dense avec de nombreux globules osmiophiles qui migrent vers la paroi cellulaire; la cellule ramollie est écrasée par les cellules voisines. Ce mode de destruction correspond à celui observé dans les anthères de Silene dioica parasitées.
- 2) le second mode de destruction est caractérisé par les parois cellulaires intactes, pendant que tout le contenu protoplasmique (noyau, mitochondries, plastes, golgi, etc...) se lyse progressivement avec un déséquilibre hydrique marqué par l'apparition de grandes vacuoles et des particules denses aux électrons.

Ce mode de nécrose produit les cellules vides récemment décrites par BATCHO, AUDRAN et ZAMBETTAKIS (1979).

Nous avons observé, dans certains ovaires, des cellules du nucelle indemnes, qui se divisent normalement malgré cette agressivité locale (PL.XXVII - fig. 8).

e) Sporulation du parasite :

Les téguments sont entièrement constitués et recouvrent le nucelle lorsqu'<u>Ustilago</u> sporule (PL.XXVIII - fig. 9 et IO). Les cellules tégumentaires très vacuolisées ont un cytoplasme moyennement dense et une paroi cellulaire fortement épaissie au contact du nucelle (PL.XXVIII - fig. II), avec des hyphes mycéliens au niveau de chaque assise.

La morphologie générale des ovules parasités est la même que celle des ovules sains, mais leur évolution est retardée par le parasite (atrophie de l'ovaire) et complètement bloquée avant le développement du sac embryonnaire. La sporulation commence toujours au centre du nucelle. Elle se fait à partir d'un mycélium riche en mitochondries, qui bourgeonne en produisant des vésicules à paroi épaisse, dont les ornementations caractéristiques des téliospores apparaissent plus tardivement. Ces téliospores peuvent se regrouper à l'emplacement du sac embryonnaire, et sont quantitativement moins nombreuses que dans les anthères puisque les cellules sporogènes qui représentent le substrat, se trouvent réduites à une par ovule dans les ovaires.

Lorsque les cellules nucellaires sont détruites et remplacées par les téliospores, il est probable que les téguments jusque là indemnes, sont attaqués à leur tour et permettent la libération des téliospores (PL.XXIX - fig. 12).

Nous avons aussi remarqué, dans certains ovaires parasités, des ovules dont les cellules nucellaires sont complètement dégénérées ; le cytoplasme clair est dépourvu de tout organite, y compris le noyau (PL.XXXI - fig. I6) ; seules les parois cellulosiques indiquant les limites cellulaires subsistent, bien que le parasite soit encore à l'état mycélien (PL.XXIX - fig. I3 et I4).

Au cours de cette dégradation, ce sont d'abord les plastes, les mitochondries, la appareil de golgi et le réticulum

endoplasmique qui disparaissent, ne laissant que des résidus membranaires. Le noyau, dont la taille est déjà considérablement réduite, est le dernier organite à se dénaturer (PL.XXX - fig. I5).

Dans le cas présent, contrairement au mode normal de la dégradation cellulaire par le mycélium d'<u>Ustilago</u>, les cellules nécrosées, beaucoup moins denses aux électrons, ne sont pas écrasées par la pression des cellules voisines puisque celles-ci sont également détruites.

Tout semble indiquer que le parasite n'est pas seul en cause dans cette lyse généralisée des tissus de l'ovule car, malgré l'altération des organites cytoplasmiques, on ne note ni sporulation, ni prolifération du mycélium au voisinage de ces cellules (PL.XXXI - fig. I7), contrairement à ce que l'on observe dans les anthères.

Enfin, tous les ovaires parasités ne renferment pas de téliospores bien qu'ils soient tous atrophiés. En observant les effets de la présence d'<u>Ustilago</u> dans les fleurs à différents stades du développement de l'ovaire, nous avons constaté que, dans certains cas, la nécrose prématurée de l'ovaire interrompt le développement de l'ovule ; ce dernier, dans d'autres cas, est si réduit que le parasite ne peut y sporuler avant sa destruction totale. Ce phénomène ne s'observe pas dans les anthères qui se développent normalement, qu'elles soient portées par les fleurs mâles ou par les femelles ; ceci laisse penser que le parasite s'installe et se développe mieux dans les cellulesmères de grains de pollen, puisque c'est toujours l'ovaire qui s'atrophie en faveur des anthères lorsque les deux éléments sont parasités dans la même fleur.

Cette étude montre bien qu'Ustilago est un parasite pour lequel les cellules sporogènes, qu'elles soient mâles ou femelles, constituent le substrat favorable à la sporulation. Son action au niveau des ovules est comparable à celle exercée sur les anthères, mais elle est ici limitée d'abord par le substrat qui est moins important, mais aussi, par le stade de

développement atteint par les ovules avant la nécrose de l'ovaire.

Dans tous les cas, lorsque les ovules sont parasités, le mycélium intercellulaire envahit le nucelle et les téguments, sans agressivité apparente dans un premier temps. Puis, au centre du nucelle, à l'emplacement des cellules sporogènes encore indifférenciées, avant même la formation du sac embryonnaire, il prolifère activement entre les cellules, pendant que le reste du nucelle est progressivement détruit et digéré au cours de la sporulation.

Lorsque la sporulation est simplement localisée au centre du nucelle dont les cellules, vidées de leur contenu, ne conservent que les parois cellulosiques, il est difficile d'expliquer comment le parasite assure sa nutrition jusqu'à la libération des téliospores. En effet, les cellules dépourvues de toute activité physiologique, ne peuvent remplacer le facteur nutritionnel le plus important qu'est le substrat. D'ailleurs, seuls quelques fragments mycéliens en début de sporulation ont été observés dans ce cas. Du reste le champignon n'est probablement pas seul en cause, à moins que cela ne soit le reflet d'un nouveau mode d'interaction entre l'hôte et le parasite.

La présence d'<u>Ustilago</u> dans les fleurs femelles développe les organes reproducteurs mâles, en inhibant la croissance de l'ovaire, et nous avons toujours observé l'atrophie de ce dernier en faveur des anthères. Il semble que le parasite ait une certaine préférence pour les cellules-mères de grains de pollen.

Il était connu qu'<u>Ustilago violacea</u> ne fructifiait que dans les anthères ; c'est la raison pour laquelle les auteurs anglais, BAKER (1947) ; SPENCER et WHITE (1951) ; EVANS et WILSON (1971) le nomment "Anther smut". Les travaux de ces derniers sur <u>Silene vulgaris</u> (M.) GARKE indiquent que le mycélium pénètre dans l'ovaire à partir du phloème et s'y comporte comme dans la tige, sans agressivité. Contrairement à ces

assertions, <u>Ustilago violacea</u> n'est pas le charbon spécifique des anthères, puisqu'il peut sporuler dans les organes reproducteurs femelles. Le tissu sporogène, qu'il soit mâle ou femelle, se révèle ainsi être le seul qui permette la fructification du champignon en provoquant, par la même occasion, la castration parasitaire. Il se comporte dans les ovules, de la même façon que dans les anthères, ce qui explique que les fleurs femelles parasitées soient également stériles. Nous n'avons pas observé les suçoirs intracellulaires décrits par WANG (1934).

En fait, les fleurs femelles sont potentiellement hermaphrodites, contrairement aux fleurs mâles qui restent à tout moment dépourvues d'ébauche d'organe femelle. Ces observations sont d'ailleurs en accord avec les résultats obtenus, sur le plan génétique, par WARMKE (1946) et WESTEGAARD (1953), ainsi que par MITTWOCH (1967). En analysant des polyploïdes et les effets de délétions, ces auteurs démontrent que le chromosome Y est un dominant absolu du sexe mâle, et que les deux chromosomes XX favorisent le développement du pistil sans éliminer l'ébauche d'étamines. En conséquence, le sexe de la plante femelle est génétiquement instable. Il est ainsi compréhensible que LOVE (1944), WARMKE (1946) et VAN NIGTEVECHT (1966) aient pu observer, dans des populations non infectées, des plantes hermaphrodites, et que HASSAN et MAC DONALD (1979) aient pu décrire des plantes monoïques. Ces anomalies, normalement rares, se généralisent en présence du parasite qui agit donc dans les limites des potentialités génétiques de la plante.

CHAPITRE XI

TROUBLES METABOLIQUES PROVOQUES PAR LA PRESENCE D'USTILAGO VIOLACEA DAMS LES ANTHERES ET LES OVAIRES DE SILENE DIOICA.

Les transformations histologiques profondes provoquées par le parasite dans les organes reproducteurs sont associées à des modifications du métabolisme général de la plante.

Afin de préciser les parts respectives prises dans ces évènements par <u>Ustilago violacea</u> et son hôte, il nous a paru intéressant de faire une étude cytochimique des anthères de Silene dioica parasités.

A - DONNEES CYTOCHIMIOUES SUR LES ANTHERES DE SILENE DIOICA PARASITEES PAR USTILAGO VIOLACEA.

Nous avons étudié comparativement l'évolution des substances glucidiques, lipidiques et protéiques au niveau des boutons floraux sains et parasités, à l'aide de la M.O. et de la M.E.T. Pour la M.O., les réactions cytochimiques employées à la détection des lipides, glucides et protéines (LISON, I969; JENSEN, I962; MARTOJA et coll., I967) ont été effectuées, soit sur du matériel fixé par le liquide de Carnoy, inclus dans la paraffine et coupé à 7 µm d'épaisseur, soit sur du matériel fixé et inclus selon le protocole utilisé pour la M.E.T. et coupé à I µm d'épaisseur.

Dans les anthères saines, seule la période antérieure à la méiose sera envisagée parce qu'elle est comparable à ce qui s'observe dans les anthères parasitées où il n'y a pas de méiose.

a) Polysaccharides:

La nature chimique des parois squelettiques des celluleshôtes et mycéliennes, et leurs éventuelles modifications, ainsi que les variations des réserves polysaccharidiques des celluleshôtes (amidon) et des cellules mycéliennes (glycogène) ont retenu notre attention.

I) Anthères saines:

Les parois squelettiques des cellules de l'anthère jusqu'à la méiose (cellules pariétales, tapétales et sporogènes) sont polysaccharidiques (APS positives), et ne diffèrent les unes des autres que par leur épaisseur (PL.XXXII - fig. I). Elles sont, en effet, de nature pectocellulosique comme le montre leur réactivité au chloroiodure de zinc, au bleu alcian et au rouge de ruthénium.

De nombreux granules amylacés, de taille variable, sont observés dans l'ensemble des tissus du bouton floral. Au niveau des étamines, cet amidon se localise préférentiellement dans les cellules périphériques du filet et du connectif, ainsi que dans les quelques cellules pariétales au voisinage du connectif. Les cellules sporogènes et tapétales ne possèdent jamais d'amidon (PL.XXXII - fig. 2 et I).

2) Anthères parasitées :

2-I - Parois squelettiques :

Durant la nécrose des cellules sporogènes et jusqu'à leur complet écrasement, les parois squelettiques qui les enveloppent (parois sporocytaires primaires) ne modifient ni leur configuration infrastructurale (PL.XXXII - fig. 3 et 4 et PL.XXXIII - fig. 5), ni leur nature chimique initiale, bien que l'on ait noté une légère baisse de leur réactivité aux colorants glucidiques, au fur et à mesure des transformations tissulaires de l'anthère. Ce n'est qu'au cours de la phase de sporulation du champignon, phase ultime de la dégradation de l'anthère, que ces parois squelettiques ne sont plus identifiables.

Par ailleurs, les zones légèrement épaissies des parois sporocytaires primaires qui se développent localement au contact du mycélium, sont aussi de nature pecto-cellulosique (PL.XXXII - fig. 3).

Le mycélium possède une paroi relativement fine qui s'épaissit considérablement au niveau des hyphes sporulants et des spores (PL.XXXIII - fig. 7 et PL.XXXIV - fig. II). La réactivité de ces parois aux tests de détection des polysaccharides est indiquée dans le tableau 34, qui souligne que les parois mycéliennes, de nature glucidique, renferment des polysaccharides acides (composés pectiques), et qu'elles sont dépourvues de cellulose, de callose et de lignine (PL.XXXIII - fig. 9 et IO).

2-2 - Amidon et glycogène :

L'amidon est pratiquement absent des tissus, sauf au niveau des étamines où nous l'observons dans la région sommitale du connectif, ainsi que dans le tissu sporogène.

Dans ce dernier, les grains d'amidon peu nombreux et de petite taille n'apparaissent que dans les cellules sporogènes pourtant déjà fortement dégradées (PL.XXXIII - fig. 7 et 8). L'observation en M.E.T. précise que cet amidon se synthétise au sein de plastes de sporocytes dégénérant (PL.XXXII - fig. 4 et PL.XXXIII - fig. 5). Cet amidon diminue ensuite et disparaît durant la phase de sporulation du champignon.

Parallèlement, on constate dans les hyphes âgés, peu avant la sporulation, la biosynthèse de réserves glycogéniques. Les granules de glycogène peuvent se présenter, soit à l'état dispersé, soit groupés dans le cytoplasme mycélien (PL.XXXIV - fig. I2).

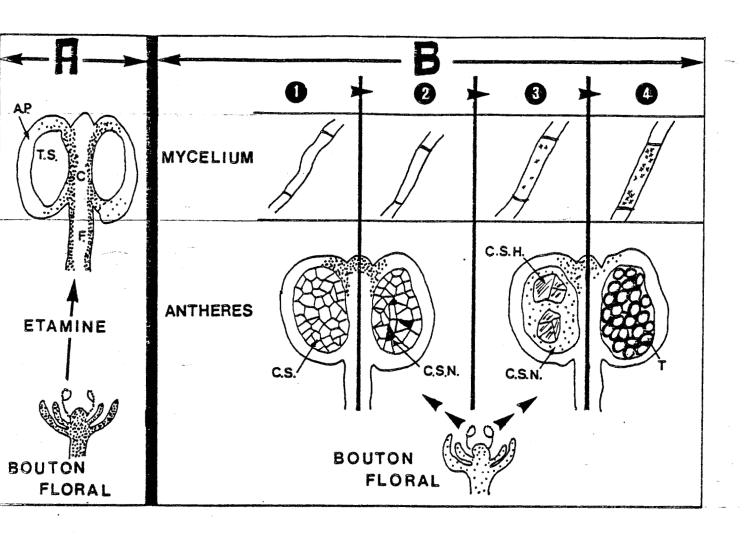
La figure I4 résume cette évolution des polysaccharides dans les anthères.

<u>Tableau 34</u>: Tableau regroupant les différentes réactions des parois mycéliennes à certains tests de mise en évidence des polysaccharides de structure.

- + présence de polysaccharides
- absence de polysaccharides

parois! réactifs!	: Jeune mycélium :	Hyphes sporulants et Téliospores
! PATAg ! (glucides génér.)	: : :	: ! : + !
A.P.S. (glucides génér.)	: : + :	: ! : + ! : !
! ! Bleu Alcian ! (glucides acides) !	: : : :	: ! : + ! : !
Rouge de ruthénium (pectines)	: : : :	! : ! : !
! Chloroiodure de ! zinc ! (cellulose) !	: : : :	: ! : - ! : : !
Phloroglucinol (lignine)	: : -	: ! : - ! : !
! Fluorescence ! (callose) !	: :	:





 $\underline{\text{Fig. I4}}$: Répartition des polysaccharides dans les boutons floraux et les étamines sains et parasités.

- Figure I4: Répartition des polysaccharides dans les boutons floraux et les étamines sains et parasités.
 - A) Bouton floral et étamines sains : Absence d'amidon dans le tissu sporogène.
 - B) Bouton floral et étamines parasités : Baisse générale de la teneur en amidon, amylogenèse dans les cellules sporogènes nécrosées et glycogenèse dans le mycélium.
 - apparition du mycélium dans les tissus de l-fanthère;
 - 2) début de nécrose des cellules sporogènes ;
 - 3) extension de la nécrose des cellules sporogènes. De l'amidon plastidial se constitue dans les cellules sporogènes nécrosées et du glycogène apparaît dans le mycélium;
 - 4) sporulation du champignon. Disparition de l'amidon et augmentation de la teneur en glycogène dans le mycélium.

A.P. : assises pariétales ; C. : connectif ; C.S. : cellules sporogènes ; C.S.H. : cellules sporogènes hypertrophiées ; C.S.N. : cellules sporogènes nécrosées et écrasées ; F. : filet ; T. : téliospores ; T.S. : tissu sporogène.

b) Les lipides .

I) Anthères saines :

La teneur en lipides visibles en M.O. grâce aux tests cytochimiques est relativement faible. Ces lipides apparaissent sous forme de gouttelettes de taille variable, mais ne dépassant pas I µm, Elles se répartissent uniformément dans le cytoplasme des cellules, et on les observe dans l'ensemble des tissus du bouton floral, avec toutefois, une plus forte teneur dans les cellules du massif sporogène (Fig. I5). Ces gouttelettes lipidiques sont colorées par le noir-soudan et se teintent en rouge violacé par le bleu de nil. Par contre, le bleu de nil sulfurique et le bleu luxol ne les colorent pas. L'acétone, le chloroforme-méthanol et la pyridine les dissolvent. Ils sont, par ailleurs, extrêmement osmiophiles. Il s'agit donc de composés lipidiques neutres et insaturés.

🗆 2) Anthères parasitées :

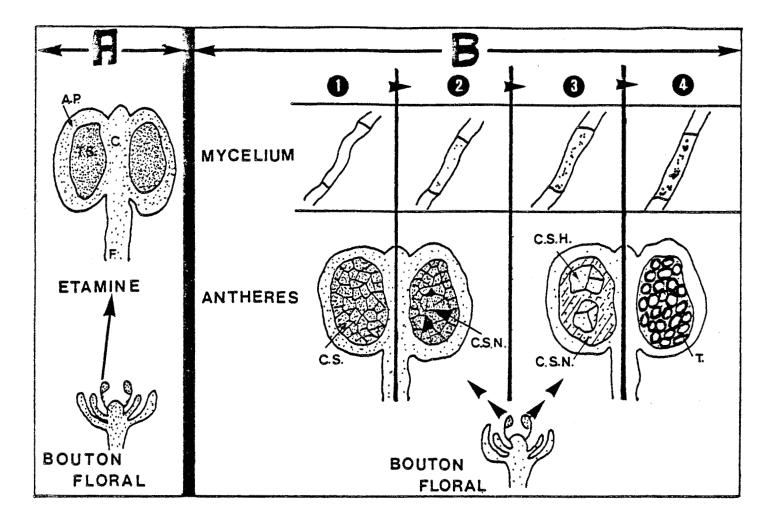
On constate d'emblée, quel que soit le stade considéré, une diminution globale de la quantité des gouttelettes lipidiques dans les tissus des boutons floraux, autres que ceux de l'anthère. Au niveau de cette dernière, l'évolution des lipides apparaît plus complexe et variable, selon que l'on s'adresse aux cellules pariétales, sporogènes ou mycéliennes (Fig. I5).

2-I - Cellules pariétales :

Les cellules pariétales se vacuolisent progressivement, alors que leur teneur en lipides diminue, et même que ceux-ci disparaissent peu avant la sporulation (PL.XXXIV - fig. I4).

2-2 - Cellules sporogènes :

Au cours de l'invasion des cellules sporogènes par le mycélium, les inclusions lipidiques augmentent légèrement, leur nombre se réduit ensuite pendant l'hypertrophie et la



- A) Bouton floral et étaminessains : La teneur du tissu sporogène en globules lipidiques est plus importante que dans les autres tissus de l'anthère ;
- B) Bouton floral et étamines parasités : Baisse générale de la teneur en lipides dans le bouton floral ; diminution progressive des lipides de l'anthère et augmentation parallèle des globules lipidiques du mycélium.
- I) Apparition du mycélium dans les tissus de l'anthère ;
- 2) Début de nécrose des cellules sporogènes ;
- 3) Extension de la nécrose des cellules sporogènes ;
- 4) Sporulation du champignon.



Globules lipidiques : ::::::::::

dégradation des cellules sporogènes. La nature chimique de ces gouttelettes lipidiques n'est cependant pas modifiée.

Les cellules sporogènes nécrosées, quelles que soient les modalités de leur dégradation (AUDRAN et BATCHO, 1979), ont une forte réaction aux colorants des lipides, réaction qui s'atténue d'ailleurs pour devenir très faible au moment de la sporulation du champignon (PL.XXXIV - fig. I3 et I4). Ce protoplasme dégradé se teinte en noir par le noir-soudan (PL.XXXIV - fig. I3), en bleu par le bleu de nil, le bleu de nil sulfurique, le bleu-luxol révélant ainsi la présence de phospholipides. En M.E.T., on remarque, au sein des masses cytoplasmiques écrasées, des restes de gouttelettes lipidiques ; sur le bord, des amas lipidiques de taille variable (PL.XXXV - fig. I5 et I6) semblent provenir de l'exsudation des lipides au cours de la dégradation des cellules sporogènes (PL.XXXVI - fig. I7). Ils possèdent la même réactivité que les globules lipidiques et disparaissent peu avant le moment de la sporulation mycélienne.

2-3 - Cellules mycéliennes :

Au début de l'invasion du massif sporogène par le champignon , les cellules mycéliennes ne renferment que quelques gouttelettes lipidiques. On constate que cette teneur en lipides va croissant parallèlement à la dégradation de l'anthère. Les lipides mycéliens réagissent alors fortement au noir-soudan, et le tracé du mycélium devient très visible (Fig. I4). Le cytoplasme, d'une part, et les lipides, d'autre part, se teintent en gris et en noir. Les lipides, initialement sous forme de petites gouttelettes, apparaissent par la suite, en masse plus importante. Ils se teintent, ainsi que le cytoplasme, en bleu violacé par le bleu de nil. Si le cytoplasme demeure incolore après le bleu de nil sulfurique et le bleu-luxol, les gouttelettes et les amas lipidiques se teintent en bleu (PL.XXXVI - fig. I8).

c) Les protéines :

Il n'y a pas de réserves protéiques dans les tissus des anthères saines (PL.XXXVI - fig. I9); dans les anthères parasitées, seules les cellules sporogènes nécrosées se teintent intensément en rouge par la ninhydrine. Leur réactivité diminue progressivement jusqu'à la période de sporulation du champignon (PL.XXXVI - fig. 20 et 21).

D'une façon générale, les anomalies structurales sont souvent le reflet de troubles plus discrets liés au métabolisme. Les transformations histologiques subies par les anthères de <u>Silene dioica</u> sous l'action d'<u>Ustilago violacea</u> en sont un exemple et nos observations confirment celles déjà faites, dans des cas similaires, sur d'autres matériels par DRYSDALE et LANGCAKE (I973), DELON et MANGENOT (I975), HERR (I975), PARK et coll. (I977).

Nos résultats précisent, par ailleurs, dans le cadre des relations hôte -parasites, certaines modalités d'action du champignon sur les substances glucidiques, lipidiques et protéiques des cellules-hôtes, en particulier les cellules sporogènes.

Les parois sporocytaires primaires, de nature pectocellulosique, conservent une structure normale au cours de la
destruction des cellules sporogènes. Ce n'est que lorsque le
mycélium parasite sporule, qu'elles disparaissent. En suivant
le comportement du mycélium de <u>Taphrina deformans</u> (Berk) Tul.,
SCHNEIDER et DARGENT (1977) avaient déjà noté que les hyphes
du parasite ne paraissent dégrader ni les parois cellulosiques,
ni la substance pectique dans laquelle ils se logent. De même,
les constituants de la paroi cellulaire (pectine, hémicellulose,
lignine, cutine, subérine et polysaccharides non cellulosiques)
paraissent peu modifiés chez les betteraves parasitées par
<u>Aphanomyces cochlioides</u> (Drechs) (LEONARD J. HERR, 1975). Il
existe néanmoins certains parasites extrêmement virulents comme
<u>Botrytis cinerea</u> (PERS.) qui provoquent une destruction de la

paroi et du contour cellulaire du parenchyme foliaire de Lactuca sativa L., 24 heures après la pénétration du champignon. On peut noter, au passage, qu'Ustilago violacea peut vivre pendant des années dans son hôte sans en troubler le développement végétatif; des pieds mâles et femelles, parasités artificiellement, et maintenus en serre depuis 6 ans, fleurissent tous les étés avec des fleurs infestées par Ustilago violacea (BATCHO et ZAMBETTAKIS, 1976). La persistance des parois squelettiques autour des cellules sporogènes en nécrose implique que le champignon agit à distance, probablement par le biais de substances très diffusibles (SCHEFFET et YODER, 1972).

L'une des conséquences de ceci est que les métabolites provenant de la cellule-hôte doivent être suffisamment mobiles pour être captés et utilisés par le champignon.

En ce qui concerne l'évolution de la teneur en amidon, la présence du champignon semble provoquer la concentration des granules amylifères au niveau de l'anthère et la biosynthèse de ce polysaccharide dans les cellules sporogènes qui en sont normalement dépourvues.

L'étude cytochimique de la microsporogenèse et du développement de l'anthère d'Iphigenia pallida (Bak) montre que les polysaccharides sont d'abord peu abondants dans les cellules polliniques et les tissus sporogènes. Leur taux augmente progressivement depuis le stade de la méiose jusqu'à celui des microspores (PANCHAKSHARAPA et SYAMASENDAR, 1974). Il serait très intéressant de suivre cette même évolution dans les boutons floraux de <u>Silene dioica</u> non parasités, afin de savoir si les cellules polliniques, comme le parasite, mobilisent les réserves réparties dans la plante et les concentrent au niveau de l'anthère pour leur propre développement.

Selon WANG (1934), "aucun amyloplaste n'a été observé dans les cellules d'une anthère parasitée". Nos observations contredisent donc les résultats de cet auteur. Tout semble se

passer comme si le mycélium provoquait une réorientation du métabolisme glucidique des cellules sporogènes, en les forçant à synthétiser de l'amidon. Un fait semblable a été observé chez le Lin et le Tournesol quand ils sont parasités par Melampsora linis (Ehreuh) L. et Puccinia helianthi (S.); 8 jours après l'inoculation et avant la sporulation des parasites, il y a une synthèse abondante d'amidon dans les cellules infestées (COFFEY, PALEVITZ et ALLEN, 1972).

Mais, fait particulier à notre matériel, ce sont les cellules sporogènes nécrosées et même écrasées qui sont affectées par cette biosynthèse plastidiale. Le champignon semble donc prendre le relai des cellules de l'hôte et contrôler les possibilités synthétiques des plastes. Cette observation souligne l'autonomie relative des plastes au sein des cellules dans lesquelles ils se trouvent. L'intervention du champignon dans l'orientation de l'activité plastidiale des cellules parasitées a été aussi notée par SCANNERI et coll. (1977), dans les endomycorrhizes d'Ornithogalum umbellatum. Généralement, et lorsqu'il existe, l'amidon synthétisé dans les cellules-hôtes disparaît (STRULLU et GOURET, 1974).

Dans le cas présent, cette disparition de l'amidon est parallèle à l'apparition de granules de glycogène dans le cytoplasme mycélien.

Ainsi, le champignon, contrôlant l'amylogenèse des cellules sporogènes, détourne les produits de cette synthèse à son profit, et utilise les métabolites libérés à la confection de ses propres réserves. Ceci conforte l'idée généralement émise, selon laquelle la disparition de l'amidon des cellules parasitées est l'expression morphologique du flux glucidique qui s'établit entre la cellule-hôte et le mycélium (LEWIS, 1975).

La nécrose des cellules sporogènes par <u>Ustilago violacea</u> provoque le démasquage des lipides hétérophasiques comme cela a été reconnu dans les cellules de laitue parasitées par <u>Botrytis cinerea</u> (PERS.) (DELON, KIFFER et MANGENOT, 1977) et les cellules d'iris infectées par <u>Heterosporium gracilis</u> (N.)S. (DELON et MANGENOT, 1975).

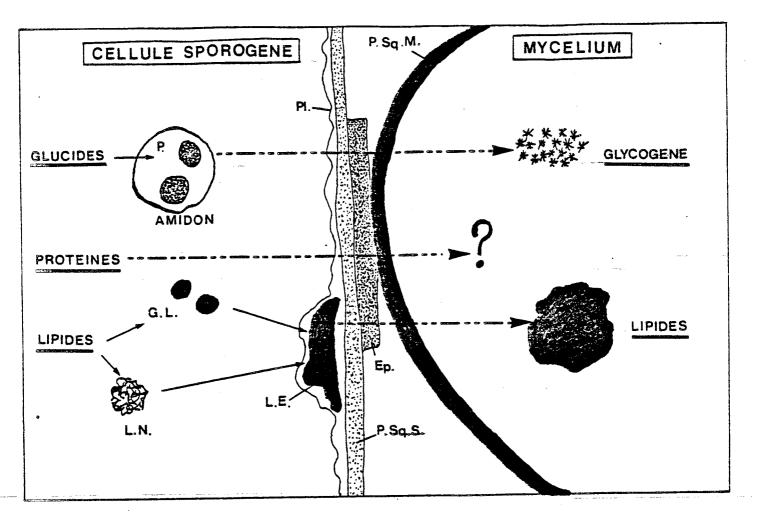


Fig. 16 : Relations trophiques entre la cellule-hôte et le champignon que permet de proposer la présente étude.

Ep. : épaississement ; G.L. : gouttelettes lipidiques ;
L.E. : lipides extracellulaires : L.N. : lipides nécrotiques ;
P. : plaste ; PL. : plasmalemme ; P.Sq.M. : paroi squelettique
du mycélium : P.Sq.S. : paroi squelettique sporocytaire.

Ces lipides, riches en phospholipides, ainsi que ceux présents sous forme de gouttelettes dans les cellules sporogènes, sont utilisés à la lipidogenèse du mycélium.

En plus des lipides, la nécrose cellulaire libère de nombreuses protéines dont le devenir n'a pu être suivi.

Ainsi, le champignon, après avoir concentré au niveau de l'anthère (lieu où le mycélium se développe abondamment et sporule), les réserves glucidiques et lipidiques réparties dans la plante, détourne l'activité synthétique du massif sporogène à la confection de ses propres réserves : lipides et glycogène. La figure I6 récapitule l'essentiel de ces propositions.

B - DONNEES CYTOCHIMIQUES SUR LES OVAIRES DE SILENE DIOICA PARASITE PAR USTILAGO VIOLACEA.

Comme dans les anthères, nous avons repris l'étude des données cytochimiques dans les ovaires, afin de comparer l'évolution des éléments nutritifs dans les deux types d'organes reproducteurs.

a) Ovules sains:

Les parois squelettiques des cellules tégumentaires, nucellaires et archésporiales, sont aussi de nature polysaccharidique (P.A.S. positive), bien qu'elles diffèrent par leur épaisseur. Avant la formation du sac embryonnaire, de nombreux grains d'amidon de taille variable, sont observés dans les cellules du nucelle. Cet amidon, synthétisé au niveau des plastes, disparaît progressivement des cellules périphériques, mais reste localisé dans les cellules centrales bordant le sac embryonnaire. Il est probable que cette évolution soit liée à celle des cellules reproductrices de l'ovaire.

b) Ovules parasités :

Quel que soit le tissu, avant la sporulation, la nature chimique des parois pectocellulosiques ne se modifie pas en présence du parasite. Lorsque le mycélium s'évagine profondément dans la cellule, il arrive que la paroi disparaisse au niveau de l'invagination. En dehors de cette particularité, elle persiste jusqu'à la nécrose totale de la cellule. C'est généralement au cours de la sporulation qu'elle n'est plus identifiable.

Ouant à l'évolution de l'amidon, seules les cellules centrales du nucelle parasité en renferment. Ces cellules, bien que voisines des filaments mycéliens en voie de sporulation, sont apparamment normales, contrairement à ce qui se passe dans les anthères où seules, les cellules fortement nécrosées présentent des plastes amylifères. Soulignons cependant que les cellules nécrosées du nucelle contiennent aussi des grains d'amidon pendant la sporulation. Parallèlement, on constate la biosynthèse de réserves glycogéniques dans le cytoplasme des cellules mycéliennes.

Les réserves lipidiques sont en quantités négligeables dans les ovules sains. Par contre, dans les ovules parasités, les gouttelettes osmiophiles de taille variable apparaissent.

Ces lipides, comme dans les anthères, migrent vers les parois qui sont en contact avec le mycélium. Ils évoluent dans les cellules mycéliennes de la même façon que dans les anthères.

Sauf dans les cellules nucellaires qui dégénèrent prématurément, les lipides et les glucides des ovules parasités servent à la nutrition d'<u>Ustilago violacea</u>. Les parois conservent leur structure jusqu'à la sporulation où elles disparaissent. Les glucides sont abondants dans les ovules sains, et très réduits dans ceux qui sont parasités. Ces glucides qui persistent dans les cellules nécrosées disparaissent au cours de la sporulation. Parallèlement, les cellules mycéliennes s'enrichissent en glycogène.

Ainsi, aussi bien dans les ovules que dans les anthères, le champignon utilise les métabolites libérés par son hôte pour la confection de ses propres réserves. Il en est de même pour les lipides qui n'apparaissent que dans les cellules nécrosées et servent à la lipidogenèse dans le mycélium.

C - ANALYSES COMPARATIVES DES ACIDES AMINES LIBRES D'ORGANES VEGETATIFS ET FLORAUX DE SILENE DIOICA SAINS ET PARASITES.

De nombreux travaux sur les racines (HRUSHOVETZ, 1954; HODGES et ROBINSON, 1977), les tiges (VANANDEL, 1966), les feuilles (BURTON et ZEEUW, 1961; SHAW et COLOTELO, 1961; ARJUNAN et coll., 1976) et les graines (CHERRY et coll., 1975) ont montré que la présence de parasites très divers sur des plantes très variées entraîne des troubles dans le métabolisme de l'azote total, des acides aminés libres et des protéines.

Ustilago violacea étant un parasite strict, nous avons réalisé cette étude pour apprécier les modifications qu'il provoque au niveau de ces éléments, lorsqu'il parasite les silènes.

L'origine du matériel (tiges et fleurs) et la méthode sont décrites au chapitre II.

Dans les plantes saines, la nature des acides aminés est identique dans les pieds mâles et femelles (tableau 35), s'il n'y a pas de différence qualitative, il y a toutefois des différences quantitatives : les acides aminés neutres sont plus abondants dans les pieds mâles ; inversement, les acides aminés basiques et acides sont en plus grande quantité dans les pieds femelles ; la répartition des acides aminés cycliques est sensiblement la même dans les plantes des deux sexes (tableau 35).

En présence du parasite, la nature des acides aminés n'est pas modifiée, mais leur teneur dans les tiges a nettement augmenté. Les concentrations en sérine-thréonine, acide aspartique, arginine et histidine sont multipliées par 5 ou 6 dans les tiges des plantes mâles.

! : ACIDES AMINES : !		TIGES SAINES :		TIGES PARASITEES !	
		Mâles	Femelles:	Mâles	Femelles
!	Glycocolle	3,6	3,4	5,6	16,8
NEUTRES	Alanine	211,2	130,2	283,4	507,2
	Valine	33,4	21,4	40,2	61,3
	Leucine	59,1	33,4	62,5	84,2
	Isoleucine	43,3	20,2	41,4	53,4
	Sérine Thréonine	58,8	44,7	303,2	: : I43,6 :
! ! !	Méthionine	0	0	0	0
ACIDES	Ac. asparti- que	11,2	22,4	57,6	III,8
	Ac. gluta- mique	104,4	126,6	152,2	: : : 313,2 :
OUES	Lysine	6,4	12,3	17,8	20,5
BASIC	Arginine	7,1	13,1	48,5	3I,5
i H	Phénylala- nine	71,2	36,4	15,6	144,5
1 0 1	Tyrosine	24,8	24,5	46,I	: : 161,8 :
. 1 2	Histidine	8,2	14,6	43,1	31,3
! ! ¼ ! 0	Proline	0	: : 0	Ő	: : 0 :

Tableau 35: Teneur en acides aminés libres (nanomoles) des tiges récoltées sur des pieds mâles et femelles de Silene dioica, parasité ou non par Ustilago violacea.



Dans les tiges des pieds femelles parasités, ce sont la sérinethréonine, l'acide aspartique, l'alanine, la phénylalaⁿine et la tyrosine qui augmentent le plus.

Les fleurs femelles sont plus riches en alanine et sérinethréonine que les fleurs mâles ; inversement, la phénylalanine et la tyrosine sont plus abondants dans ces dernières. La teneur des autres acides aminés est sensiblement la même dans les deux types de fleurs (tableau 36).

Sous l'effet du parasite, la teneur en acides aminés des fleurs mâles est fortement augmentée et, de plus, la méthionine inexistante dans les fleurs saines apparaît. Dans les fleurs femelles, la sérine-thréonine, et les acides aminés acides s'accumulent sous l'effet du champignon, alors que la teneur des autres acides aminés diminue et que la phénylalanine et la tyrosine disparaissent (tableau 36). La proline est absente aussi bien des fleurs que des tiges.

En résumé, l'infection de la plante par <u>Ustilago violacea</u> détermine la disparition de la tyrosine et de la phénylalanine dans les fleurs femelles, et provoque l'apparition de la méthionine dans les fleurs mâles. Elle provoque aussi l'augmentation des teneurs en acides aminés dans ces dernières, et une diminution de certains d'entre eux dans les fleurs femelles.

Les protéines des graines d'arachides (Arachis hypogaeal.) infectées par Aspergillus parasiticus sont hydrolysées en plusieurs constituants de faible poids moléculaire, qui disparaissent à mesure que progresse le champignon. Parallèlement, les acides aminés libres augmentent. Selon CHERRY et coll. (I975), le parasite déclenche une série d'évènements au cours desquels les protéines hydrolysées se transforment finalement en acides aminés libres qui seraient utilisés pour ses propres besoins.

L'augmentation des acides aminés des fleurs mâles et la diminution de certains dans les fleurs femelles sous l'action d'<u>Ustilago violacea</u> est aussi comparable aux observations de

ACIDES AMINES		: FLEUPS SAINES :		FLEURS PARASITEES !	
		Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
NEUTRES	Glycocolle	: 8,4	6,9	60,2	: : 6,4
	Alanine	172,3	246,5	620,8	196,8
	Valine	: 66,I	69,2	130,4	: : 24,8
	Leucine	63,2	52,8	120,8	14,6
	Isoleucine	: : 55,8 :	37,5	91,3	: : II,3 :
	Sérine Thréonine	89,1	213,1	276,7	: : 442,4 :
	Méthionine	0	0	7,2	; o
ACIDES	Ac. aspar- tique	6,2	7,3	62,4	47,I
	Ac. gluta- mique	: 86,3 :	90,4	368,9 :	: : 136,6 :
UES	Lysine	8,6	9,2	9,4	5,4
BASIO	Arginine	: : 13,8 :	: 24,7 :	5I , 6	: 12,4
ES	Phénylala- nine	49,2	29,4	132,2	0
CYCLIQU	Tyrosine	: : 6I,I :	: : 26 2 :	191,4	: 0
	Histidine	: 14,5	33,2	58,2	13,1
	Proline	: 0	: : 0 :	0	: : 0

Tableau 36 : Teneur en acides aminés libres (nanomoles)

des fleurs mâles et femelles de <u>Silene dioica</u>,

parasité ou non par <u>Ustilago violacea</u>.



ARJUNAN et coll. (1976) sur les feuilles de sorgho parasitées par <u>Helminthosporium turcicum</u>; dans ce cas, tous les acides aminés et amides, à l'exception de l'asparagine et de la méthionine, diminuent dans les feuilles âgées de dix jours, sous l'effet du parasite. Ces acides aminés augmentent considérablement à l'exception de l'acide glutamique et de la glutamine dans les feuilles âgées de 60 jours. Le parasite, qui est tributaire de son hôte pour ses besoins en acides aminés, réduirait ces derniers dans les jeunes pieds qui en contenaient suffisamment; alors que, dans les feuilles âgées où la quantité est insuffisante, il se servirait de ses enzymes protéolytiques pour la dégradation des protéines de son hôte.

Dans le cas de Silene dioica parasité, quel que soit le sexe de la plante (mâle ou femelle) ou l'organe étudié (tige ou organes floraux), la présence d'Ustilago violacea entraîne l'augmentation de la teneur en sérine-thréonine et en acides aspartique et glutamique. Cette modification ne semble pas liée à la masculinisation des plantes génétiquement femelles, puisque ces dernières ont une teneur plus élevée en chacun des acides aminés. Elle peut être due, soit à un blocage de la chaîne de synthèse ou de dégradation de ces acides aminés, soit à leur excrétion ou leur utilisation par le parasite.

Bien que nous n'ayons pas pu cultiver le mycélium dicaryotique d'<u>Hstilago violacea</u> en dehors de son hôte, nous savons que les souches levuroïdes excrètent très peu d'acides aminés dans leur filtrat de culture; par conséquent, les troubles provoqués par le parasite seraient peut-être liés aux modifications du métabolisme de l'hôte.

C H A P I T R E XII

CONSIDERATIONS GENERALES

Nous avons étudié la germination des téliospores d'<u>Ustilago</u> <u>violacea</u> et déterminé les conditions de milieu, de température, de lumière et de pH favorables à sa croissance, comme l'ont fait de nombreux auteurs sur d'autres Ustilago (NIELSEN, 1972; BECERESCU, 1973; HUGUENIN, 1974).

L'étude de la germination des téliospores nous a permis de constater que celles qui sont fraîchement récoltées germent à presque 100%; ce pourcentage est réduit de 99 % après un an de conservation à $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$, alors que selon SPENCER et WHITE (1951), 9 % seulement germent après deux mois de conservation à 20°C .

Lorsqu'elles viennent d'être récoltées, les téliospores germent sur des milieux très divers, et les bons résultats obtenus à la température du laboratoire (21 \pm 1°C), même sur eau distillée stérile, soulignent que les téliospores n'ont aucune exigence particulière.

Les travaux de HASSAN et MAC DONALD (1971) ont d'ailleurs montré qu'elles germent aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité, à des températures comprises entre 5 et 38°C. Cette indifférence n'est cependant pas générale, puisque les téliospores d'<u>Ustilago tritici</u> germent mieux à l'obscurité qu'à la lumière qui exerce une inhibition marquée entre 460 nm et 600 nm (KRAJNY, 1974).

Signalons aussi que FORSYTH (1955) a mis en évidence un phénomène d'autoinhibition de la germination des Urédospores de <u>Puccinia graminis</u> Var. <u>tritici</u> par suite d'émission du triméthyl-éthylène.

La germination des téliospores d'<u>Ustilago violacea</u> nous a permis d'isoler des sporidies compatibles (+) et (-), susceptibles de se conjuguer. Les travaux de POON et DAY (1974-1975) ont montré, par la technique d'ombrage et de cryodécapage, que la face externe de leur membrane est hérissée de fins appendices pileux appelés "fimbriae", en raison de leur

à des températures élevées (HALL, 1971). D'ailleurs, les températures pou élevées limitent la fructification de certains Basidiomycètes, tels les Agaricales, dont le nombre de carpophores de diverses espèces est réduit entre 14 et 20°C (FLEGG, 1968). Toutefois, la température optimale pour la fructification d'Agaricus bisporus est comprise entre 14,5 et 16,5°C (ATKINS, 1966).

Nous avons ensuite précisé que les pH compris entre 5 et 6 sont les plus favorables à la conjugaison d'<u>U. violacea</u>. En dessous de pH₅ et audessus de pH₈, elle est fortement inhibée sauf dans l'eau. Chez <u>Arachniotus albicans</u>, le pH initial du milieu compris entre 5 et 7 a peu d'influence sur la reproduction sexuée (LACOSTE et DUJARDIN, 1972). Les périthèces sont plus nombreux à pH_{5,2} et ne se forment plus à pH inférieur à 3,2 chez <u>Gnomonia vulgaris</u>, contrairement à <u>G.intermedia</u> qui produit le maximum de périthèces à pH 3,2 (HENRIKSSON et MORGAN-JONES, 1951).

Enfin, la reproduction de certains parasites tels que <u>Phytophtora palmivora</u> n'est pas sensible à l'effet du pH, le rôle le plus important étant joué par le rapport C/N (HUGUENIN, 1974). Seul le mycélium dicaryotique formé par les sporidies conjuguées d'<u>U.violacea</u> est capable d'infecter la plante-hôte. Nous n'avons obtenu la formation de ce mycélium sur milieu synthétique qu'à un faible pourcentage, quelles que soient les conditions réalisées. <u>Ustilago violacea</u> se comporte donc différemment d'<u>U.nuda</u> dont on cultive facilement le mycélium dicaryotique en dehors de l'hôte, mais dont l'isolement des sporidies haploīdes exige des conditions particulières (NIELSEN, 1972).

Selon BECERESCU (1973), l'usage des rayons X à des doses variables peut, soit stimuler, soit inhiber la croissance du mycélium dicaryotique de <u>U.nuda</u>, <u>U.tritici</u>, <u>U.nigra</u>, <u>U.avena</u>, <u>U.hordei</u> et <u>U.cynedontis</u>.

Nous n'avons pas pu étudier l'action de ce facteur sur le développement de <u>U.violacea</u> et, si pour certains auteurs (BAKER, 1947; HASSAN et MAC DONALD, 1971), il est impossible de cultiver son mycélium dicaryotique en dehors de l'hôte, il nous faut reconnaître que, malgré nos différents essais, nous n'avons pas encore maîtrisé complètement les modalités de cette culture.

étroite ressemblance avec les fimbriae (pili) trouvé chez certaines bactéries Gram négatives. Des poils semblables ont été observés chez <u>U.maydis</u> et <u>Leucosporidium candida</u> et chez toutes les espèces présentant une forme levuroïde (<u>Rhodotorula</u>, <u>Saccharomyces</u>, <u>Lypomyces</u>, <u>Torulopsis</u>, etc...). Il semble que ces poils jouent un rôle important pendant la conjugaison chez Ustilago violacea (DAY, 1976).

Le développement ultérieur des sporidies exige, d'une part, la présence de vitamine B₁, ce qui confirme les résultats de SCHOPFER et BLUMER (1938) et, d'autre part, celle d'un sucre, par exemple le saccharose que nous avons choisi parce qu'il permet, en outre, la croissance des tissus isolés des hôtes naturels (<u>Silene alba et S.dioica</u>). Nous préconisons la dose de 3 % de saccharose pour la culture des sporidies bien que, contrairement à ce qu'on observe avec les tissus de Phanerogames (GAUTHERET, 1959), les doses supérieures à 100 g/l inhibent peu la croissance du champignon. La température optimale de croissance est de l'ordre de 25°C; cette croissance est presque nulle en dessous de 2,5°C et au-dessus de 35°C.

Comme la germination des téliospores, la conjugaison des sporidies (+) et (-) ne semble pas avoir d'exigences particulières puisque nous l'avons obtenue à un taux élevé, aussi bien dans l'eau distillée que sur le milieu nutritif de LESCURE (1966). Elle n'est pas influencée par le rapport C/N du milieu comme c'est parfois le cas (HUGUENIN, 1974). Elle se déroule aussi bien à l'obscurité qu'à la lumière, alors que chez de nombreuses espèces de champignons, la lumière, à un stade déterminé, est indispensable à la sexualisation (TOUSSOUN et WEINHOLD, 1967; DEHORTER, 1972; MERIMOTO et ODA, 1974). Parfois même, comme chez Coprinus congregatus, l'influence de la lumière est complexe (MANACHERE, 1970).

L'âge des sporidies d'<u>Ustilago violacea</u>, leur densité dans le milieu de culture et la température, influent sur la conjugaison qui est inhibée au-dessous de 10°C et au-dessus de 22°C. L'inhibition provoquée par les températures élevées est à rapprocher du blocage de la reproduction sexuée mise en évidence chez divers Ascomycètes (HENRIKSSON et MORGAN-JONES, 1962; DEHORTER, 1972); cela n'est cependant pas un phénomène général, puisque chez <u>Sordaria fimicola</u>, les périthèces sont plus nombreux

Nous avons aussi constaté que les sporidies excrètent au cours de leur culture des substances inhibitrices de la conjugaison. Il s'agit de molécules dialysables et thermostables. Il n'est pas exclu qu'il s'agisse d'acides aminés ou de sucres particuliers ; nous savons par exemple que certains acides aminés réduisent le pouvoir pathogène de certains champignons (VAN ANDEL, 1966), et que Rhizoctonia solani, cultivé en milieu liquide, excrète des acides aminés tels que l'acide glutamique, le glycocolle, l'histidine, etc... (REDDY et RAO, 1975). Les sporidies d'U.violacea secrètent également des substances toxiques pour la croissance des tissus isolés de Silene alba (BATCHO et DUBOIS, 1974). Cette toxicité n'est d'ailleurs pas spécifique puisqu'elle se manifeste aussi à l'égard des tissus de Carotte, d'Erable ou de Scorsonère. L'identité entre l'inhibition de la conjugaison du champignon et l'inhibition de la prolifération des cellules végétales n'a pas été établie, et nous nous garderons d'extrapoler les résultats obtenus avec des souches levuroïdes se multipliant facilement sur un milieu synthétique et ceux fournis par un mycélium dicaryotique parasite. Toutefois, l'inhibition de la croissance des tissus et de suspensions cellulaires de S.alba pourrait expliquer le nanisme observé chez diverses silènes parasitées par U.violacea (BAKER, 1947; VIENNOT-BOURGIN, 1949; EVANS et WILSON, 1971).

Nous avons identifié et déterminé la nature de certains produits d'excrétion des sporidies d'<u>U.Violacea</u>. Quatre enzymes : la phosphatase acide, la phosphatase basique, la phosphoamidase et l'estérase lipase ont été mises en évidence dans le filtrat de culture. La concentration des protéines excrétées dans ce filtrat évolue en fonction de la croissance des souches. Les acides aminés libres et protéiques excrétés ont été identifiés.

Tout ceci nous a permis de noter que seuls, les acides aminés acides tels que l'acide glutamique et l'acide aspartique produits en grande quantité, pourraient inhiber la conjugaison des sporidies compatibles, étant donné que les pH très acides sont défavorables à la conjugaison (DUBOIS et coll., 1977). Quant aux enzymes, elles ont été retrouvées en quantités plus importantes dans le milieu de culture des suspensions cellulaires de <u>S.alba</u> et, de ce fait, ne peuvent être responsables de l'inhibition de leur croissance.

Nous avons ensuite tenté d'obtenir <u>in vitro</u> les modifications morphologiques provoquées par <u>Ustilago violacea</u> sur <u>S.dioica</u>. Dans la nature, ceci n'est généralement possible que pendant la période de floraison des Silènes, et une étude ne pouvait être rigoureuse que si les plantes entières étaient maintenues dans des conditions précises de température, de lumière et d'humidité; de plus, pour être à l'abri de toute contamination accidentelle, les cultures devaient être rigoureusement aseptiques.

Dans un premier temps, les techniques de culture <u>in vitro</u> nous ont permis d'obtenir la floraison de <u>Silene alba</u> dans des conditions satisfaisantes à partir de fragments de tige comportant un ou deux bourgeons axillaires, dont l'induction de la floraison est réalisée dans la nature. Ces fragments de tige sont repiqués en position normale, sur milieu gélosé dépourvu de phytohormones ; éclairés 24 h sur 24 par une lumière du type lumière du jour (12.000 lux), maintenus à une température constante de $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$, ils fleurissent dans un temps relativement court (8 à 15 jours). Par ailleurs, ces plantes, qui peuvent atteindre 80 cm dans la nature, produisent <u>in vitro</u> des fleurs après une élongation moyenne de 8 cm ; ce qui signific que nos conditions expérimentales permettent la réduction de l'élongation de la tige sans inhiber la floraison.

Dans le cas de <u>Silene armeria</u>, 4 jours longs d'éclairement suffisent pour assurer la floraison à 100 %, et deux gibberellines (A₃ et A₇) provoquent cette floraison en jours courts (CLELAND et ZEEVAART, 1970). Selon ces auteurs, les gibberellines endogènes sont les facteurs qui contrôlent l'élongation des tiges, sans influencer la floraison. Cette hypothèse est confirmée par WELLENSIEK (1975) qui a démontré que chez certaines Silènes, la formation des fleurs et l'élongation des tiges peuvent être considérées comme deux processus distincts.

Dans le cas des Silènes, <u>S.alba</u> est plus adaptée aux fortes intensités lumineuses que <u>S.dioica</u> qui est une plante d'ombre, et selon WILLMOT et MOORE (1973), <u>Silene dioica</u> est plus adaptée aux faibles intensités lumineuses par sa capacité à limiter la baisse de son taux de photosynthèse. Nous avons montré que les deux espèces peuvent néanmoins

fleurir parfaitement dans les mêmes conditions (BATCHO, 1979).

Par la suite, en mettant en culture des fragments de tiges parasitées, nous avons obtenu des fleurs parasitées, ce qui nous a permis de résoudre le problème difficile de la désinfection des téliospores. Des inoculums d'origines différentes (téliospores, sporidies haploïdes, sporidies conjuguées) ont été alors réalisés pour infecter <u>Silene alba</u> et <u>S.dioica</u> à différents stades de développement (plantules, rosettes, fragments de tige), afin de vérifier le pouvoir pathogène des téliospores obtenues <u>in vitro</u>. Soulignons que ces infections sont réalisées sur des plantes cultivées en champ, en serre et in vitro.

Depuis les travaux de HOTSON et CUTTER (1951), au moins une dizaine de téliomycètes, considérés comme parasites obligatoires, ont été cultivés en association avec les tissus isolés de l'hôte; plusieurs ont pu se développer dans des conditions saprophytiques (WILLIAMS et coll., 1967; TUREL, 1969). INCRAM (1973) a répertorié les espèces ayant donné lieu à des cultures associées, mais il ne signale aucune Ustilaginale, bien que depuis lors, de nombreux charbons aient sporulé sur milieu synthétique. Nous avons obtenu le cycle complet de l'<u>Ustilago violacea</u> dans des conditions rigoureusement contrôlées. Les premières étapes (germination des téliospores, entretien des souches levuroïdes axéniques et conjugaison des sporidies compatibles), s'effectuent en milieu synthétique en dehors de l'hôte. Les dernières étapes (croissance du mycélium dicaryotique, formation des téliospores) se déroulent dans des cultures de fragments de tiges isolées de <u>Silene alba</u> (BATCHO et DUBOIS, 1975).

Le passage de la phase saprophytique à la phase parasitaire est réalisé par injection dans les tissus de l'hôte d'une suspension de sporidies conjuguées (fig. 17).

Certes, WANDERWALLE et SOMMEREYNS (1965), ainsi que NIELSEN (1968) avaient obtenu des épis charbonneux d'orge, après inoculation de mycélium dicaryotique ou de téliospores d'<u>Ustilago nuda</u>. De même, HASSAN et MAC DONALD (1971), après injection de téliospores d'<u>Ustilago violacea</u> dans les bourgeons axillaires des jeunes plantules ont observé des fleurs charbonnées de <u>Silene dioica</u>. Mais tous ces travaux ont été réalisés sur des plantes entières cultivées dans la nature et ne permettent pas de préciser les facteurs qui influent sur le développement du champignon et de son hôte.

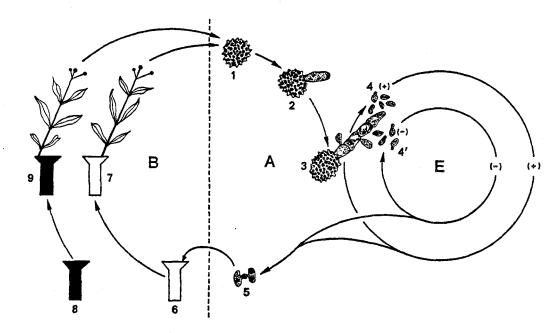


Fig. 17: Culture in vitro de l'Ustilago violacea

A. Phase saprophytique, en milieu synthétique. B. Phase parasitaire: culture associée avec un fragment de tige de Silene alba: en blanc, fragment de tige prélevé sur une plante saine; en noir, fragment de tige prélevé sur une plante déjà infectée. — 1. Téliospore aseptique; 2. Germination de la téliospore et formation d'une archéobaside; 3. Emission des sporidies haploïdes + et —; 4 et 4'. bourgeonnement des sporidies haploïdes et entretien, E, des cultures levuroïdes; 5. Conjugaison de deux cellules levuroïdes compatibles; 6. Infection d'un fragment de tige saine de Silene alba par une suspension de cellules levuroïdes conjuguées; 7. Formation des fleurs charbonnées; 8. Culture in vitro d'un fragment de tige de Silene alba prélevé sur une plante déjà infectée; 9. Formation de fleurs charbonnées.

Notre travail met bien en évidence le pouvoir pathogène des téliospores récoltées <u>in vitro</u>; il montre aussi que les sporidies haploïdes en sont dépourvues alors qu'elles sont toxiques à l'égard des plantules et des tissus isolés de silènes. L'action parasitaire des sporidies conjuguées s'exerce aussi bien sur les plantules, les rosettes et les fragments de tiges, qu'ils soient cultivés en champ, en serre ou <u>in vitro</u>. Cette action parasitaire n'est ailleurs pas altérée par les basses températures hivernales.

Nous avons aussi montré que le même <u>Ustilago violacea</u> peut parasiter <u>Silene alba</u> et <u>S.dioica</u> qui sont sensibles au parasite quel que soit leur stade de développement.

Notre travail, à certains égards, s'apparente à celui réalisé par RAYNAL (1974) sur <u>U.maydis</u>. Cet auteur a pu obtenir des contaminations artificielles, en injectant avec une seringue hypodermique des sporidies cultivées en milieux liquides agités. RADULESCU et MUNTEANU (1967) avaient d'ailleurs remarqué que la contamination par <u>U.maydis</u> était possible pendant toute la période végétative de la plante. BECERESCU (1973) a, de son côté, montré que la pénétration des Ustilaginales (<u>U.nuda</u>, <u>U.tritici</u>, <u>U.nigra</u>, <u>U.hordei</u>) pouvait se faire par des organes très différents, sans préférence particulière pour l'un ou l'autre.

Malgré les précisions supplémentaires que nous avons pu apporter sur l'<u>Ustilago violacea</u> et sur ses hôtes habituels <u>Silene alba</u> et <u>Silene dioica</u>, il nous a fallu aborder les aspects cytologiques pour expliquer pourquoi ce champignon ne développe ses téliospores que dans les organes floraux de ses hôtes, et pourquoi il provoque la différenciation d'anthères dans les fleurs femelles qui en sont normalement dépourvues.

Pour cela, nous avons d'abord localisé le mycélium dans les tissus de <u>Silene dioica</u> avant la floraison car, si de nombreux auteurs (BAKER, 1947; GIULIANO, 1962; HASSAN et MAC DONALD, 1971; BATCHO et ZAMBETTAKIS, 1976) ont étudié le mode d'infection des silènes par <u>Ustilago violacea</u>, très peu ont recherché la présence du parasite dans les organes autres que les fleurs.

Notre travail montre que le mycélium, très fin, est intercellulaire et se déplace surtout dans les composés pectiques de la lamelle moyenne, ainsi que dans les méats; il est, dans la tige, dépourvu de toute agressivité, et se localise surtout au niveau des méristèmes apicaux. On le retrouve aussi en abondance dans les méristèmes des bourgeons axillaires. Il disparaît de toutes les parties différenciées de la tige, il est absent des tissus conducteurs qui continuent de jouer leur rôle de transporteur, ce qui fait qu'aucun signe de flétrissement ne s'observe en présence du parasite, contrairement à ce qui est fréquent avec d'autres champignons (ROBB et coll., 1977; ALEXANDER et HALL, 1977).

Ces observations nous ont permis de comprendre pourquoi il était difficile de distinguer une plante saine d'une plante parasitée avant la formation des fleurs, et pourquoi des plantes artificiellement parasitées et maintenues en serre depuis 6 ans fleurissent chaque été, en produisant des fleurs charbonnées.

Ainsi, contrairement à GIULIANO (1962) qui pense que le mycélium d'<u>Ustilago violacea</u> traverse les cellules épidermiques et parenchymateuses, qu'il détruit au passage avant d'atteindre les faisceaux criblo-vasculaires, et à SPENCER et WHITE (1951) qui le situent juste en-dessous du méristème apical, nous avons constaté que le parasite suit le développement de la plante, installé dans les zones indifférenciées des bourgeons axillaires et apicaux.

Ce comportement peut se comparer à celui d'Ustilago bromi erecti, parasite du brome, qui est présent dans toutes les parties pérennes de la plante (bourgeons souterrains et rhizome), et est capable, comme Ustilago violacea, de s'y maintenir plusieurs années (10-12 ans). Chaque printemps, le mycélium qui est localisé dans les méristèmes apicaux se répand dans la tige en voie d'élongation. Le même phénomène s'observe chez Ustilago agrestis, dans les tiges des Agropyrum et Ustilago striiformis sur Dactylis glomerata (VIENNOT-BOURGIN, 1965). Ustilago nuda qui parasite l'orge et le blé s'installe dans le caryopse pendant la formation de la graine et attend le développement des plantules pour se localiser dans les méristèmes apicaux. L'action destructrice de l'U.nuda est totale, l'épi entier est transformé en amas sporifère (MALIK et BATT, 1960) contrairement à celle d'Ustilago violacea sur Silene dioica et alba, où les pièces florales, autres que les anthères et les ovaires, sont intactes et se développent normalement. Toutefois, lorsque ce parasite s'attaque à Saponaria officinalis, on a observé des pétales bifides et une soudure particlle des étamines au niveau du filet (WERTH, 1913).

Nous avons aussi suivi l'évolution du mycélium d'<u>U.violacea</u> dans les organes reproducteurs, en commençant par les anthères pour expliquer comment les téliospores remplacent les grains de pollen.

La présence très prématurée du mycélium dans tous les tissus de l'anthère n'empêche pas la différenciation complète et normale de ces organes jusqu'au stade préméiotique. Là, il réalise une sorte d'analyse sélective des divers tissus qui constituent le sac pollinique, en commençant par les cellules sporogènes, qu'il attaque spécifiquement ; il inhibe la différenciation des cellules du tapis, empêche la méiose de se réaliser, et l'endothécium, qui devrait évoluer en assise mécanique responsable de la déhiscence de l'anthère, reste au stade parenchymateux.

D'une manière générale, il interrompt l'histogenèse de l'anthère à un stade juvénile et détruit spécifiquement les cellules sporogènes selon deux modalités différentes (nécrose immédiate et nécrose précédée d'hypertrophie). On peut distinguer cinq étapes dans l'évolution des transformations histologiques qui aboutissent à la destruction des anthères. 1°) Apparition du mycélium dans les tissus de l'anthère sans que l'aspect histologique de cette dernière soit modifié. 2°) Début de la nécrose du massif sporogène; seules certaines cellules centrales sont affectées par cette lyse, et se contractent en masses denses. 3°) Généralisation du processus de nécrose à l'ensemble du massif sporogène. L'hypertrophie de ces cellules est liée à une forte vacuolisation et précède leur destruction. 4°) Les hyphes se développent abondamment au sein de la masse nécrosée des cellules sporogènes. 5°) Le champignon sporule par fragmentation du mycélium, et les téliospores s'accumulent dans la cavité sporangiale.

Ainsi, le mycélium dicaryotique d'<u>Ustilago violacea</u> ne révèle son agressivité que lorsqu'il se trouve au contact des cellules sporogènes ; rappelons qu'il peut vivre au ralenti, et de façon inoffensive pendant plusieurs années au contact des cellules méristématiques, et qu'il disparaît de tous les tissus différenciés de la tige.

Nous en avons conclu que les cellules sporogènes constituent le substrat indispensable à la sporulation d'<u>Ustilago violacea</u>, et que ce dernier réagit à la disparition de ce substrat en produisant des spores de conservation "Les téliospores".

Très peu de parasites ont une action aussi spécifique et localisée qu'<u>Ustilago violacea</u>. Un autre exemple de destruction de l'androcée est fourni par <u>Botrytis anthophila</u> qui se développe dans le trèfle (<u>Trifolium pratense</u>), en Russie, dans plusieurs régions de l'Europe Centrale, en Ecosse et en Suède : les conidiophores se forment principalement aux dépens des anthères qui prennent une coloration grise ; le vent et les abeilles étant les principaux vecteurs de la maladie (VIENNOT-BOURGIN, 1965).

Notre travail a permis de confirmer l'apparition des anthères dans les fleurs femelles lorsqu'elles sont infectées par Ustilago violacea. Ces anthères ont une morphologie classique et le comportement du parasite y est le même que dans les fleurs mâles parasitées. La fleur femelle devient morphologiquement hermaphrodite, et nous avons démontré que, si le parasite n'induit pas la formation des anthères, il exalte les potentialités de la plante qui sont limitées génétiquement. En effet, toutes les fleurs femelles présentent un pistil et deux verticilles de staminodes, à l'état d'ébauches méristématiques ; mais seul, le pistil se développe lorsque la fleur est saine. Nous en concluons que le sexe de la fleur femelle est instable et potentiellement hermaphrodite. Les fleurs mâles sont elles unisexuées, qu'elles soient saines ou parasitées. Nos observations sont en accord avec celles de WARMKE (1946), WESTERGAARD (1953) et MITTWOCH (1967) selon lesquelles il existe chez Melandrium album et M.rubrum (Silene alba et S.dioica) un chromosome sexuel Y qui caractérise le sexe mâle et un chromosome X qui caractérise le sexe femelle. Selon ces auteurs, il n'est pas surprenant que les pieds femelles qui possèdent certaines caractéristiques mâles soient capables de les exprimer à des degrés divers dans certaines conditions (par exemple, lorsqu'ils sont parasités).

Nous avons aussi montré qu'<u>U. violacea</u> est présent dans les ovaires des fleurs femelles parasitées. Nous avons suivi son évolution dans les ovules. La différenciation de ces derniers est plus tardive que celle des anthères, et de nombreux auteurs (WANG, 1934; BAKER, 1947; EVANS et WILSON, 1971; BATCHO, 1973, 1976) ont remarqué l'atrophie de l'ovaire sous l'effet du parasite. Le mycélium envahit les tissus de l'ovule avant même la formation des téguments et, comme dans les anthères, attaque d'abord les cellules sporogènes, puis le nucelle, sporule et libère les téliospores, soit par le micropyle, soit après la destruction des téguments. Ce phénomène ne s'observe pas dans les ovaires dont le développement est plus ou moins réduit. Dans certains cas, il est si atrophié que les ovules ne se forment qu'incomplètement et avortent. Toutefois, quelle que soit la taille de l'ovaire, le mycélium dicaryotique est toujours présent.

Les cellules sporogènes, qu'elles soient mâles ou femelles, constituent donc le substrat indispensable à la sporulation d'<u>U.violacea</u>. On pensait jusqu'à présent que ce charbon ne sporule que dans les anthères, et les auteurs anglo-saxons l'avaient surnommé "the anther smut". (BAKER, 1947; SPENCER et WHITE, 1951; DAY et DAY, 1970; EVANS et WILSON, 1971; DAY, 1972; DAY et JONES, 1972; DAY et CUMMINS, 1974; POON et DAY, 1974, 1976; DAY, 1978). Il peut donc aussi sporuler dans l'ovaire, et son action est comparable dans les deux types d'organes reproducteurs.

Dans le cas de <u>Claviceps purpurea</u>, parasite du Seigle, on observe aussi la destruction du gynécée; l'ovaire est digéré et remplacé par une masse compacte de structure cornée-alvéolée appelée sclérote ou ergot (VIENNOT-BOURGIN, 1965). Ce parasite agit aussi sur les fleurs d'<u>Agropyrum repens</u> qui sont normalement stériles, et sur les fleurs de blé privées d'étamines et de pistil et, même, sur les restes de glumes lorsqu'il attaque un épi préalablement détruit par <u>Ustilago tritici</u>.

Pour ce parasite, contrairement à <u>Ustilago violacea</u>, les organes reproducteurs ne constituent donc pas un facteur indispensable à la sporulation. Pour préciser le rôle de facteurs énergétiques dans les relations hôte-parasites, nous avons suivi l'évolution des constituants de la paroi cellulaire (cellulose, callose, lignine, pectine) de l'amidon et du glycogène, puis celle des lipides et des protéines dans les anthères de <u>Silene dioica</u> saines et parasitées. Nous avons montré que, dans tous les tissus des organes floraux des boutons sains, à l'exception des cellules sporogènes, il y a de l'amidon. Les lipides neutres et insaturés apparaissent partout sous l'aspect de petites gouttelettes qui sont cependant plus abondantes dans les cellules sporogènes.

Lorsque les boutons sont parasités, les parois cellulaires conservent leur structure jusqu'à la fin de la nécrose des cellules sporogènes. La teneur en amidon diminue dans les organes floraux et disparaît du filet de l'anthère : il se localise au niveau du connectif. Il est encore présent dans les cellules sporogènes nécrosées, mais disparaît complètement pendant la sporulation. Dans le même temps, le cytoplasme des cellules mycéliennes s'enrichit en glycogène. Les lipides essentiellement

localisés au niveau des cellules sporogènes, lorsque les boutons sont parasités, diminuent progressivement jusqu'à la phase de sporulation du parasite. Parallèlement, le nombre et la taille des globules lipidiques des cellules mycéliennes augmentent. Nous avons même noté que des gouttelettes osmiophiles du cytoplasme migrent vers la paroi dans la zone de contact avec le mycélium ; certaines de ces gouttelettes ont été observées dans le milieu extracellulaire, sans pouvoir affirmer qu'elles traversent la paroi mycélienne.

Il en résulte qu'<u>U.violacea</u> mobilise toutes les ressources énergétiques de son hôte pour son propre développement. Ses besoins nutritifs au moment de la sporulation sont tels que les lipides, les protéines et certains organites cellulaires ne suffisent plus ; il provoque la synthèse de l'amidon dans les cellules sporogènes nécrosées et digère l'ensemble du massif avant de sporuler. Pendant ce temps, il s'attaque aux assises pariétales sous sa forme mycélienne, préparant ainsi la libération des téliospores.

DELON et MANGENOT (1975) ont étudié les modifications ultrastructurales de l'Iris parasité par <u>Helminthosporium gracile</u>, WHITE, CALVERT et BROWN (1973) celles des feuilles de blé infectées artificiellement par <u>Helmintosporium maydis</u>. Ils montrent comment, sous l'effet des parasites, les chloroplastes se désintègrent pendant que les globules osmiophiles de taille variable apparaissent.

Enfin, sachant que la présence d'un parasite provoque dans une plante des troubles du métabolisme et, en particulier, celui de l'azote, (HRUSHOVETZ, 1954; ALLAN et RAYMOND, 1965; SHAW et COLOTELO, 1961; BURTON et ZEEUW, 1975; HODGES et ROBINSON, 1977), nous avons étudié les modifications des acides aminés libres provoquées par <u>U.violacea</u> dans les tiges et dans les fleurs mâles et femelles de <u>S.dioica</u>. La présence du parasite entraîne dans les plantes mâles une augmentation générale de tous les acides aminés, et fait apparaître la méthionine dans les fleurs mâles; de plus, il augmente le taux des acides aminés dans les tiges et le diminue dans les fleurs femelles, où on constate la disparition de la tyrosine et de la phénylalanine. Des modifications de la teneur en acides aminés ont été signalées dans de nombreux cas de parasitisme, par exemple dans les concombres parasités par <u>Cladosporium cucumerium</u>; l'asparagine et la glutamine sont réduits de façon considérable

dans les tissus infectés, et cette réduction apparaît 72 heures après l'inoculation; elle coïncide avec les premiers symptômes de l'infection (BURTON et ZEEUW, 1975).

Dans certains cas, si l'infection n'entraîne pas de modification qualitative des acides aminés libres, elle provoque toutefois une baisse sensible de l'arginine, de la sérine, de la thréonine, de l'acide aspartique, et une augmentation d'alanine dans les mûres parasitées par <u>Glomerella cingulata</u> (ALLAN et RAYMOND, 1965). Selon VAN ANDEL (1966), ces troubles du métabolisme de l'azote sont en réalité liés aux conditions nutritionnelles du parasite. Toutefois, même en absence de parasite, le taux d'acides aminés libres peut servir à apprécier l'état physiologique d'une plante, puisqu'il permet de déterminer les besoins en azote des vignes de Californie (MARK et COOK, 1971); et le contenu en arginine des graines d'arachides donne de précieux renseignements sur le degré de maturité des échantillons, ce qui est une bonne méthode pour fixer les périodes de récoltes, pour obtenir des produits de bonne qualité (CLYDE et MASON, 1972).

Ainsi, l'évolution du taux d'azote, qu'elle soit naturelle ou provoquée par la présence d'un parasite, peut être utilisée comme un facteur déterminant dans la physiologie de la plante et, dans le cas de <u>Silene dioica</u> parasitée par <u>U.violacea</u>, il constitue un indice des troubles métaboliques provoqués par le parasite dans son hôte.

Ce travail, indépendamment des précisions apportées sur la biologie du champignon (germination des téliospores ; croissance ; conjugaison ; excrétion), et sur celle de ses hôtes (floraison in vitro), a permis d'étudier les effets de l'un sur l'autre dans le cadre des relations hôte-parasites, à commencer par les infections artificielles (pouvoir pathogène des téliospores, des sporidies haploïdes et des sporidies conjuguées sur différents stades de développement de l'hôte). Nous avons localisé le parasite avant la floraison, et expliqué par là même pourquoi une plante parasitée peut porter des fleurs charbonnées pendant plusieurs années. Nous avons aussi expliqué pourquoi ce champignon sporule dans les anthères, et défini le rôle joué par les différents tissus de cet organe.

Nous avons démontré l'importance des cellules sporogènes (mâles ou femelles) comme substrat indispensable à la sporulation du parasite, soulignant ainsi que le terme "anther smut" utilisé par les auteurs de langue anglaise n'est pas approprié.

Notre travail précise aussi la part prise par le champignon dans le déterminisme génétique de la plante. Enfin, dans le domaine des relations hôte-parasites, certains aspects métaboliques concernant les lipides, les glucides et les protéines ont été abordés.

Pourtant de nombreuses questions restent encore posées à propos de ce phénomène de castration parasitaire, car nous ignorons toujours pourquoi le champignon supprime l'avortement habituel des étamines des fleurs femelles, et leur permet d'avoir une taille normale, les rendant comparables à celles qui se forment dans les fleurs mâles. Pourquoi ce champignon qui sporule aussi dans les ovules n'induit-il pas la formation d'ovaires dans les fleurs mâles?

Il reste aussi à préciser les modalités de culture du mycélium dicaryotique d'<u>U.violacea</u> en dehors de son hôte et celles de la sporulation du parasite sur milieu synthétique.

Toutes ces questions que notre travail laisse encore sans solution, méritent de retenir l'attention des biologistes.

- AHOKAS H., 1978. Cytoplasmic male sterility in barley. Physiology and anther cytology of msml. Hereditas., 89, 7-21.
- ALBERSHEIM P. JONES T.M. ENGLISH. P.D., 1969. Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes Rev. Phytopath., 7, 171-194.
- ALLAN W.S. and RAYMOND A.C., 1965. Changes in free amino acids and reducing sugars in highbush blueberry fruit infected with Clomerella cingulata. Phytopath., 55, 302-303.
- ALEXANDER S.T. and HALL R., 1974. <u>Verticillium</u> wilt of <u>Chrysanthemum</u> anatomical observations on colonization of roots, stems and leaves. Can. J. Bot., 52, 783-789.
- ALEXOPOULOS C.J., 1958. Introductory mycology. 3ème Edit. Chapman and Hall. London. 482 pages.
- API. ZYM., 1977. réf. 2520-2521. A P I Système. Lab. Balme les Grottes. Montalieu-Vercieu, France.
- ARJUNAN G.P. VIDHYASEKARAN T.K. KANDASWAMY, 1976. Changes in amino acids and amides content in jowar leaves infected by Helminthosporium turcicum. Current. Sci., 45, 229-230.
- ATKINS F.C., 1966. Mushroom growing to-day. Faber and Faber Limited, London.
- AUDRAN J.C., 1977 a. Autolyse sélective des ribosomes et élaboration de dépôts lipidiques paraplasmiques précédant l'écrasement des cellules pariétales des microsporanges du <u>Ceratozamia mexicana</u> au cours de la palynogénèse. Rev. Cyt. Biol. Vég., 40, 151-180.
- AUDRAN J.C. et BATCHO M., 1980. Aspects infrastructuraux des altérations des anthères de <u>Silene dioica</u> parasitées par <u>Ustilago violacea</u>.

 Can. J. Bot., <u>58</u> (4), 405-415.

- AUDRAN J.C. et BATCHO M., 1979. Transformations et destruction des anthères de <u>Silene dioica</u> (L.) CL. parasitées par <u>Ustilago violacea</u> (Pers.) Rouss. Etude en microscopie électronique à transmission. Ann. Sc. Univ. Reims, <u>16</u>, 1-24.
- AUDRAN J.C. et BATCHO M., 1980. Localisation de l'<u>Ustilago violacea</u> (Pers.) Rouss. dans les tissus de <u>Silene dioica</u> (L.) CL. au stade végétatif. Ann. Phytopath, 12 (1), 45-55.
- AUDRAN J.C., 1977. Recherches cytologiques et cytochimiques sur la genèse des grains de pollen et des exines chez les Cycadales. Thèse Doct. Univ. Reims.
- AUDRAN J.C. et BATCHO M., 1980. Cytochemical and infrastructural aspects of pollen and tapetum ontogenis in <u>Silene dioica</u> (L.) CL. Grana. (sous presse).
- AUDRAN J.C. et BATCHO M., 1980. Microsporogenesis and pollen grains in Silene dioica (L.) CL. and alterations in its anthers parasited by <u>Ustilago violacea</u> (Pers.) Rouss. Acta. Sot. Bot. Pologne. (sous presse).
- BAIRD A.M., 1939. Contribution to the life history of Macrozamia reidlii J. J.R. Soc. West. Aust. XXV, 153-175.
- BAKER H.G., 1947. Infection of species of Melandrium by Ustilago violacea (Pers.) Fuckel. and the transmission of resultant disease.

 Ann. Bot., 11, 333-348.
- BAKER H.G., 1948. Stages in invasion and replacement demonstrated by species of <u>Melandrium</u>. J. Ecol., <u>36</u>, 96-119.
- BARBARA J.W. and BOONE D.M., 1963. -Venturia inaequalis. Cke. Amino acids in relation to pathogenicity of two wild type lines to two apple varieties. Phytopath., 53, 979-983.
- BATCHO M., JEAN R. et BOURIQUET R., 1980. Modification de la morphogenèse des fleurs mâles et femelles de <u>Silene dioica</u> (L.) Clairv. parasitées par l'<u>Ustilago violacea</u> (Pers.) Rouss. Bull. Soc. Bot. Fr., 127 (1), 35-46.

- BATCHO M., 1976. Etude de l'<u>Ustilage violacea</u> (Pers.) Rouss., son action sur <u>Silene alba</u> (Miller) E.H.L. Krause et <u>Silene dioica</u> (L.) Clairv. Thèse Doct. 3ème cycle Biol. Vég. Univ., Lille I 81 P.
- BATCHO M. et DUBOIS J., 1975. Développement de l'<u>Ustilago violacea</u> (Pers.)
 Rouss. dans des fragments de tige du <u>Silene alba</u> (Miller) E.H.L.
 Krause, cultivés in vitro. C.R. Acad. Sc. Paris, 281, 399-402.
- BATCHO M. et DUBOIS J., 1975. Etude de quelques effets de l'<u>Ustilago</u>

 <u>violacea</u> (Pers.) Rouss. sur la croissance de colonies tissulaires
 et de suspensions cellulaires du <u>Silene alba</u> (Miller) E.H.L.

 Krause. Bull. Soc. Bot. N. France, 28 (3), 51-59.
- BATCHO M. et ZAMBETTAKIS Ch., 1975. Obtention in vitro de fleurs du <u>Silene dioica</u> (L.) Clairv. parasité par l'<u>Ustilago violacea</u> (Pers.) Rouss. Bull. Soc. myc. Fr., 91(2), 225-229.
- BATCHO M., 1973. Etude de quelques effets de l'<u>Ustilago violacea</u> (Pers.)

 Fuckel. sur la croissance et la morphogenèse du <u>Silene alba</u>

 (Miller) E.H.L. Krause, cultivé in vitro. D. E.A. de Biol.

 Vég. Univ. de Lille I.
- BATCHO M. et AUDRAN J.C., 1980. Sporulation de l'<u>Ustilago violacea</u> (Pers.)
 Rouss. dans les ovaires de <u>Silene dioica</u> (L.) CL.
 Phytopath. Z. (sous presse).
- BATCHO M. et AUDRAN J.C., 1980. Données cytochimiques sur les anthères de <u>Silene dioica</u> (L.) CL. parasité par <u>Ustilago violacea</u> (Pers.) Rouss. Phytopath. Z, 99, 9-25.
- BATCHO M.,1979. Contribution à l'étude de la floraison in vitro de Silene alba (Miller) E.H.L. Krause. Ann. Sc. Univ. Reims., 16 (1), 25-28.
- BATCHO M. et ZAMBETTAKIS Ch., 1976. Infection par l'<u>Ustilago violacea</u> (Pers.)
 Rouss. de <u>Silene alba</u> (Miller) E.H.L. Krause et <u>Silene dioica</u> (L.)
 Clairv. à différents stades de leur développement.
 Bull. Soc. Mycol. Fr., 92 (4), 413-421.
- BATCHO M., DUBOIS et ZAMBETTAKIS Ch., 1976. La conjugaison in vitro chez l'Ustilago violacea (Pers.) Rouss. Modalités, influence des facteurs externes et développement des filaments mycéliens.

 Rev. Mycol., 40, 141-159.
- BATCHO M. et CARDON C., 1980 Présence d'enzymes, d'acides aminés libres et protéiques dans le milieu de culture de l'<u>Ustilago violecea</u> (Pers.) Rouss. Crypt., Mycol., <u>1</u>, 19-27.

- BATCHO M., AUDRAN J.C. et ZAMBETTAKIS Ch., 1979. Sur quelques données de l'évolution de l<u>'Ustilago violacea</u> (Pers.) Rouss. dans les ovules de <u>Silene dioica</u> (L.) Clairv. Rev. Cytol. Biol. Végét. Bot., 2, 329-346.
- BAUCH. R., 1922.- Kopulationsbedingungen und sekundäre geschlechtsmerkmale bei Ustilago violacea. Biol. Zentbl., 42, 9-38.
- BECERESCU D., 1973. The influence of X-radiatons on the growth of the dicaryotic mycelium and the behaviour of haploid strains of certain species of <u>Ustilago</u>. Rev. Roum. Biol. Bot., <u>18</u> (2), 119-124.
- BECERESCU D., 1968. Considerations concerning the mode of infection of the <u>Ustilago</u> species. "Microbiologia", Lucr. confer. nation. Microbiol. Gen. aplic. Bucarest, vol. 1, 575-577.
- BELLEMERE A., 1978. Caractères généraux des champignons in Mycologie et Pathologie forestières Masson et Cie. Paris, (1), 9-30.
- BHOJWANI S.S. BHATNAGAR S.P., 1977. The embryology of angiosperms.

 V. Publishing House. P.V.T. Ltd. New-Delhi.
- BINOD. BIHARI. L. RAM P.R. SHYAMA. P.S. MAHENDRA. P., 1976. Variation in amino acids in the growing culture of <u>Alternaria alternata</u>. Fr. Current. Sci., 45, 150-152.
- BLARINGHEM L., 1923. Notes sur la biologie des rouilles et des charbons. Rev. Path. Végét. et d'Entom. agri., 10, 246-252.
- BOISSIERE J.C., 1977. Présence d'haustoriums chez le Lichen <u>Lichina</u>

 pygmea, et rôle de la paroi des gonidies dans le contact entre
 les symbiontes des Lichens à cyanophytes. Rev. Bryol. Lichénol.,
 43, 173-182.
- BOUCHET Ph., 1979. Abrégé de Cryptogamie. Masson et Cie. Paris. 207 pages.

- BRACKER C.E., 1968. Ultrastructure of the haustorial apparatus of <u>Erysiphe graminis</u> and its relationship to the epidermal cell of barley. Phytopath., 58, 12-30.
- BRACKER C.E. and LITTLEFIELD. L.J., 1973. Structural concepts of host-pathogen interfaces. In. Fungal pathogenecity and the plant's response. Byrde R.J.W. Cutting C.V. Ed. Acad. Press. London and New-York., 159-318.
- BRASSART C., DUBOIS J. et BOURIQUET R., 1977. Nutrition carbonée d'une suspension cellulaire de Silène (Silene alba. M. Kr).

 C.R. Acad. Sc. Paris., 285, 759-762.
- BREFELD 0., 1883. -Botanische untersuchungen. Uber hefenpilze. Untersuchungen aus dem gesammtgebiet der MyKologie V.Die brandpilze, Liepzig, 1 (b), 220.
- BRONCKERS F. et AMAND. H., 1966. Etude des effets du gamétocide (FW.450) sur Beta vulgaris. L. La Cellule. LXVI, 109-126.
- BURTON C.F. and de ZEEUW. F.J., 1961. Free amino acids constitution of healthy and scab-infected cucumber foliage. Phytopath., <u>51</u>, 776 777.
- BUVAT R., 1971. Origin and continuity of cell vacuoles. In origin and continuity of cell organelles. R.J. Ursprung. H. Ed. Springer, 127-157.
- BYRDE R.J.W. FIELDING A.H. ARCHER S.A. DAVIES E., 1973. The role of extracellular enzymes in the rotting of fruit tissue by Sclerotinia fructigena. in. Fungal pathogenicity and the plant response. Edit. R.J.W. BYRDE and C.V. CUTTING. Acad. Press. New-York, P. 39-54.
- CAPOOR S.W., 1937. The life history of <u>Holoptelea integrifolia</u>. PL. Beich. Cot. Centlbl., 57 (A), 249-283.
- CARMOY, 1887. In Précis de microscopie LANGERON. P. 435.
 Masson et Cic. Edit. 1949.

- CARROLL T.W. MAYHEW D.E., 1976.- Anther and pollen infection in relation to the pollen and seed transmissibility of two strains of barley stripe mosale virus in barley. Can. J. Bot., 54, 1604-1621.
- CHADEFAUD H. GRASSE.P.P. OZENDA.P. PREVOT A.R., 1963. Précis des sciences biologiques. Masson et Cie. Paris.
- CHADEFAUD M., 1960. Traité de Botanique. Tome 1. Masson et Cie. Paris.
- CHERRY J.P. YOUNG C.T. and BEUCHAT L.R., 1975. Changes in proteins and free and total amino acids of peanuts (<u>Arachis hypogaea</u>)infected with <u>Aspergillus parasiticus</u>. Can. J. Bot., <u>53</u>, 2639-2649.
- CHRISTIANSEN H., 1960. On the effect of low temperature on meiosis and pollen fertility in Larix decidua. M.S. Gen., 9,72-78.
- CHRISTENSEN J.E. HORNER H.J. LERSTEN N.R., 1972. Pollen wall and tapetal orbicular wall development in <u>Sorghum bicolor</u>. Am. J. Bot., 59, 43-58.
- CLELAND C.F. and ZEEVAART J.A.D., 1970. Gibberellins in relation to flowering and stem elongation in the long day plant <u>Silene</u> armeria. Plant. Physiol., 46, 392-400.
- CLEMENT L.L. DAY A.W. JONES J.K., 1969. Effects of Ultra violet light on nuclear fusion in <u>Ustilago violacea</u>. Nat. G.B., <u>223</u> (5209), 961-963.
- CLINTON F.H. and PHILIP W.R., 1977. Sugar and amino acids contents of

 Poa pratensis infected with <u>Ustilago striiformis</u> and <u>Urocystis</u>

 agropyri. Physiol. Plant., <u>41</u>, 25-28.
- CLYDE J.Y. and MASON M.E., 1972. Free arginine content of peanut (Arachis hypogaea. L.) as a measure of seed maturity. J. Y. Food. Sc., 37, 722-725.
- COFFEY D.M. PALEVITZ B.A. and ALLEN P.J., 1972. Ultrastructural changes in rust-infected tissues of flax and sunflower. Can. J. Bot., $\underline{50}$, 1485-1492.

- COULOMB. C., 1972. Processus lytiques dans les vacuoles des cellules radiculaires méristématiques de la Scorsonère.

 Thèse. Marseille-Luminy.
- COUSIN M.T., 1978. Tapetum and pollen grain of <u>Vinca rosea</u>.

 Ultrastructure and investigations with the scanning-electron microscope. GRANA (sous presse).
- COUVY J., 1973. La croissance du mycélium végétatif et la fructification chez <u>Agaricus sylvicola</u> F. Influence de la teneur en sucre du milieu. C.R. Acad. Sc. Paris, 277, 917-920.
- CUMMINS J.E. et DAY A.W., 1973. Cell cycle regulation of mating type alleles in the smut fungus <u>Ustilago violacea</u>. Nature. London, 245, 259-260.
- CUMMINS J.E. et DAY A.W., 1974. The cell cycle regulation of sexual morphogenesis in a Basidiomycete. <u>Ustilago violacea</u>.

 In cell cycle controls. 181-200. Acad. Press. New-York, San Francisco, Londres.
- CUMMINS J.E. and DAY A.W., 1974. Transcription and translation of the sex message in the smut fungus <u>Ustilago violacea</u>. The effects of inhibition. J. Cell. Sci., 16, 49-62.
- DAY A.W., 1979. Mating type and morphogenesis in <u>Ustilago violacea</u>. Bot. Gaz. 140 (1), 94-101.
- DAY A.W. WELLMAN A.M. and MARTIN J., 1972. Recombinaison in

 <u>Ustilago violacea</u> after liquid nitrogen refrigeration.

 Can. J. Microl., 18 (11), 1639-1641.
- DAY A.W., 1976. Communication through fimbriae during conjugation in a fungus. Nat., 262 (5569), 583-584.
- DAY A.W., 1978. Chromosome transfer in dikaryons of a smut fungus. Nat., $\underline{273}$ (5665), $\underline{753}$ -755.

- DAY A.W., 1972. Dominance at a fungus mating type locus. Nat. New. Biol., 237 (78), 282-283.
- DAY A.W. and DAY L.L., 1970. Ultraviolet light sensitive mutants of Ustilago violacea. Can. J. Genet. Cytol., 12, 891-904.
- DAY A.W. and JONES K.J., 1972. Somatic nuclear division in the sporidia Of <u>Ustilago violacea</u>. I. Acetic orcein staining.

 Can. J. Microb., <u>18</u> (5), 663-670.
- DAY A.W. and CUMMINS J.E., 1974. Transcription and translation of the sex message in the smut fungus, <u>Ustilago violacea</u>.

 The effect of ultraviolet light. J. Cell. Sci., <u>14</u>, 451-460.
- DAY A.W. and JONES J.K., 1969. Sexual and parasexual analysis of <u>Ustilago</u> <u>violacea</u>. Genet. Res. Camb., <u>14</u>, 195-221.
- DAY A.W. and DAY L.L., 1974. The control of karyogamy in somatic cells of <u>Ustilago violacea</u>. J. Cell. Sci., <u>15</u>, 619-632.
- DAY A.W. and JONES J.K., 1968. The production and characteristics of diploids in <u>Ustilago violacea</u>. Genet. Res., Camb., <u>11</u>, 63-81.
- DEBRE R. et NEVOT A., 1938. Sur le problème de l'étiologie de l'acrodynie infantile. Ann. Pediat., 152 (5), 253-276.
- DEHORTER B., 1972. Biologie et physiologie de la reproduction sexuée de Nectria galligena Bres. Thèse 3ème cycle, Univ. Lille I.
- De LANCHE J.E., DELVOSALLE L., DUVIGNEAU D., LAMBINON J., VANDEN.BERGHEN C., 1963. Nouvelle flore de la Belgique, du G.D. du Luxembourg, du Nord de la France et des régions voisines.

 Edit. du patrimoine du Jardin Botanique National de Belgique.
 B-1030 Bruxelles.
- DELON R. et MANGENOT F., 1975. Etude ultrastructurale des interactions hôte-parasite.I. L'hétérosporiose de l'Iris.

 Can. J. Bot., 53, 1994-2005.

- DELON R., KIFTER E., MANGENOT F., 1977. Ultrastructural study of host-parasite interactions. II. Decay of lettuce caused by Botrytis cinerca and Phyllosphere bacteria.

 Can. J. Bot., 55, 2465-2470.
- DELON R., 1974. Etude ultrastructurale et comparative des relations plante-hôte-champignon de deux agents pathogènes <u>Pyrenochaeta lycopersici</u>. G. et <u>Colletotrichum coccodes</u>. W. des racines. de tomate. Thèse Doct. Ingen. Nancy.
- De ROPP R.S., 1947. The response of normal plant tissues and of crowngall tumor tissue to synthetic growth hormones.

 Am. J. Bot., 34, 53-62.
- DRYSDALE R.B. LANGEAKE. P., 1973. Response of tomato to infection by

 Fusarium oxysporum. F. Lycopersici in fungal pathogenicity
 and the plant's response.

 BYRDE.R.J.W. CUTTING.C.V. Ed. Acad. Press. London and New-York.
- DUBOIS J., BATCHO M. et BOUSQUET J.F., 1977. Effet du pH sur la conjugaison in vitro chez <u>Ustilago violacea</u> (Pers.) Rouss. C.R. Acad. Sc., 284, 619-622.
- DUBOIS J. BOURIQUET R., 1974. Culture de cals et de suspensions cellulaires du <u>Silene alba</u> (Miller) E.H.L. Krause.

 Bull. Soc. Bot. Nord. Fr., 26-27, 70-88.
- DUBOIS J., 1975. Analyse quantitative de la croissance d'une culture de cellules du <u>Silene alba</u> (Miller) E.H.L. Krause.
 Bull. Soc. Bot. Fr., 122, 269-280.
- DURRIEU G. et ZAMBETTAKIS Ch., 1973. Les <u>Ustilago</u> parasites des Caryophyllacées. Apports de la microscopie électronique. Bull. Soc. Myc. Fr., 89, 283-290.
- EDWARSON J.R., 1970. Cytoplasmic male sterility.
 The Bot. Rev. XXXVI, 341-419.

- EVANS S.M.and WILSON T.M., 1971. The anther smut of sea campion.

 A study of the role of growth regulators in the dwarfing symptom. Ann. Bot., 35, 543-553.
- FAVRE-DUCHARTRE M., 1970. Des ovules aux graines. Aspects cytologiques de la reproduction sexuée chez les plantes supérieures.

 Ed. Masson et Cie. Paris.
- FAYRET J., 1967. Action de la température et de la lumière sur la multiplication asexuée et la reproduction sexuelle de Cnomonia leptostyla. Fr. en culture pure. C.R. Acad. Sci. Paris, 265, 1897-1900.
- FINERAN B.A., 1970. Effects of various factors of fixation on the ultrastructural preservation of vacuoles in root tips.

 Cellule, LXVIII: 269-286.
- FLEGG P.B., 1968. Response of the cultivated mushroom to temperature at various stages of crop growth.

 J. Hort. Sci., 43, 441-452.
- FORSYTH, 1955. The nature of inhibiting substance emitted by germinating uredospores of <u>Puccinia graminis</u>. Var. <u>Tritici</u>. Can. J. Bot., 33 (5), 363-373.
- GAHAN P.B., 1973. Plant lysosomes in Lysosomes in biology and pathology. Ed. J.T. DINGLE. North-Holland, Amsterdam $\frac{3}{2}$ p. 69-85.
- GARAY A. and SAGI F., 1960. Investigation on sex reversal in Melandrium album. Mill. after infection with particular reference to auxin-oxidase and flavonoids.

 Phytopath. Z., 38 (2), 201-208.
- GAUTHERET R.J., 1959. La culture des tissus végétaux.

 Masson et Cie. Paris.

- GENEVES L., 1971. Phénomènes ultrastructuraux au cours de la méiose staminale chez Ribes rubrum L. Bull. Soc. Bot. Fr., 118, 481-524.
- GIARD A., 1888. Notes sur la castration parasitaire du <u>Lychnis dioica</u>.L. par l'<u>Ustilago antherarum</u>. Fr. C.R. Acad. Sci., Paris, 107, 757-759.
- GIULIANO E., 1965. Ricerche sugli stami dei fiori sani e parassitati del Melandrium album (Miller) Garcke. Nota preliminare.

 G. Bot. Ital., 71 (3-5), 291-292.
- GIULIANO E., 1962. Osservazioni sul <u>Melandrium album</u> (Miller.) Garcke.

 parassitato da <u>Ustilago violacea</u> (Pers.) Rouss.

 Delpinoa. Ital., 4 (1), 177-200.
- GLAUERT M.A. et GLAUERT R.H., 1958. Araldite as an embedding medium for electron microscopy. J. Biophys. Biochem. Cytol., 4, 191-194.
- GREIG J.R., 1924. Note on the association of <u>Tilletia tritici</u> with "epileptiform convulsions" in the dog.

 Trans. Bri. Myc. Soc., 121-122.
- GRIMLEY P.M., ALBRECHT J.M., MICHELITCH J.M., 1965. Preparation of large epoxy sections for light microscopy as an adjunct to fine structure studies. Stain Technol., 40, 357-366.
- GUERIN P., 1926. Le développement de l'anthère chez les Gentianacées. Bull. Soc. Bot. Fr., 73, 5-18.
- HALL R., 1971. Effet of carbon nitrogen ratios on production of perithecia by <u>Sordaria fimicola</u>. Can. J. Microbiol., <u>17</u> (1), 132-134.
- HANSSLER G., MAXWELL D.P., BARCZEWSKI UND BERNHARDT E., 1977.
 Cytochemische lokalisation der sawren phosphatase in hyphen von

 Pythium paroecandrum, Botrytis cinerea und Rhizoctonia solani.

 Phytopath. Z., 88, 289-298.

- HASSAN A. and MAC DONALD J.A., 1971. <u>Ustilago violacea</u> on <u>Silene dioica</u>.

 Trans. Br. mycol. Soc., 56 (3), 451-461.
- HEIM P., 1971. Le noyau dans la vie du champignon. Ann. Sc. Nat., 12 (4), 466-513.
- HELLER R., 1953. Recherche sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. Ann. Sc. Bot. Biol. Végét., 14, 1-223.
- HENRIKSSON L.E.E. and MORGAN JONES J.F., 1951. The effect of temperature, pH and malt extract upon growth and perithecial development of two Gnomonia species. Svensk. bot. Tidsk., 45, 648-656.
- HERR. J.L., 1974. Histopathology and Histochemistry of sugar beet seedlings resistant and susceptible to <u>Aphanomyces cochlioedes</u>.

 Can. J. Bot., 53, 283-294.
- HESLOP-HARRISON J., 1966. Cytoplasmic connections between angiosperm meiocytes. Ann. Bot., 30, 221-230.
- HIRATA S., 1957. Studies on the phytohormone in the malformed portion of the diseased plants. Auxin formation of the culture grown Exobasidium, Taphrina and Ustilago.
 Ann. phytopath. Soc. Japan., 22, 153-158.
- HODGES C.F., 1972. Effect of infection by <u>Ustilago striiformis</u> var <u>agrostidis</u> on inflorescence developpement on <u>Agrostis palustris</u>. Phytopathology, 62 (5), 583-584.
- HOHL. H.R. STOSSEL P., 1976. Host-parasite interfaces in a resistant and a susceptible cultivar of Solanum tuberosum inoculated with Phytophtora infestans. Tuber tissue. Can. J. Bot., 54, 900-912.
- HOLTON, C.S., HOFFMANN J.A. and DURAN, R., 1968. Variation in the smut fungus. Ann. Rev. phytopath. Vol. 6, 213-242.
- HORNER H.T., 1977. A comparative light and electron microscopic study of microsporogenesis in male fertile and cytoplasmic male sterile sunflower. Helianthus annuus.

 Am. J. Bot. 64, 745-759.

- HRUSHOVETZ S.B., 1954. The effect of infection by <u>Helminthosporium</u> sativum on the amino acids content of wheat roots.

 Can. J. Bot. 32, 571-575.
- HUGUENIN B., 1974. Influence des conditions de culture sur la formation et la germination in vitro des chlamydospores de <u>Phytophtora</u> palmivora. Ann. phytopath., 6 (4), 425-440.
- HUTSON B. et CUTTER W.M., 1951. The isolation and culture of

 <u>Gymnosporangium Juniperi virgininae</u>. Schw. upon artificial
 media. Proc. nat. Acad. Sc. U.S.A., 37, 400-403.
- INGOLD C.T. et DRING V.G., 1957. An analysis of spore discharge in Sordaria. Ann. Bot. London., 21, 465-477.
- INGRAM D.S., 1973. Growth of plant parasites in tissue culture.

 In plant tissue and cell culture, H.E. Street, Blackwell. Sc.
 Publ. London., 392-421.
- JEAN R., 1974. La létalité pollinique dans le système génétique du sousgenre Eu-Oenothera. Thèse. Doct. Univ. Lille I, 179 pages.
- JENSEN W.A., 1962. Botanical histochemistry. W.H. Freeman and Company.

 San Francisco and London.
- JOHANSEN D.A., 1940. Plant microtechnique. Mac Graw Hill Book Company, Inc., New-York and London.
- JONES 0.T., 1963. The accumulation of amino acids by fungi, with particular reference to the plant parasitic fungus <u>Botrytis</u> fabae. J. Exp. Bot., 14, 399-411.
- KNIEP. H., 1919. Untersuchungen Uber den antherenbrand (<u>Ustilago violacea</u> Pers.). Ein Beitrag Zum sexualitäts problem. Zeitschr. J. Bot., 11, 257-284.

- KRAJNY P., 1974. Influence of various wave lenghts of light on germination of chlamydospores of fungus <u>Ustilago tritici</u> (Pers.) Jen. Biologia (Bratislava), <u>29</u>, 257-262.
- LACOSTE L., 1965. Biologie naturelle et culturale du genre <u>Leptosphaeria</u>

 Cesati et de Notaris. Déterminisme de la reproduction sexuelle.

 Thèse Univ. de Toulouse.
- LACOSTE L. et DUJARDIN L., 1972. La reproduction sexuée d'<u>Arachniotus</u>

 <u>albicans Apinis</u>. Influence de l'équilibre carbone-azote et du pH.

 Bull. Soc. Mycol. Fr. T. LXXXVIII (1), 5-14.
- LAMPORT D.T.A., 1964. Cell suspension cultures of higher plants: isolation and growth energetics. Experim. Cell. Res, 33, 195-206.
- LASER K.D. LERSTEIN N.R., 1972. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. Bot. Review., 38, 425-454.
- LEAN R.C. IVIMEY-COOK. W.R., 1958. Textbook of theorical botany. Tome I.

 Long-man Green and Co. London, New-York, Toronto. Second Edit.

 1069 pages.
- LEGRAND B., BATCHO M., BOUSQUET J.F. et DUBOIS., 1977. Comparaison des acides aminés libres et des peroxydases d'organes végétatifs et floraux de Silènes dioiques (Silene dioica) sains ou parasités par <u>Ustilago violacea</u>.

 Phytopath. Z., 90, 273-280.
- LESCURE A.M., 1969. Mutagenèse et sélection des cellules d'<u>Acer</u>
 pseudoplatanus. L. cultivées in vitro. Physiol. vég., 7, 237-250.
- LEWIS D.M., 1975. Comparative aspect of the carbon nutrition of mycorrhizas in Endomycorrhizas. Edit. F.E. SANDERS. B. MASSE et P.B. TINKER. Acad. Press. London, New-York, P. 119-148.
- LISON L., 1960. Histochimie et cytochimie animales. 2 tomes. 3ème Edit. Gauthier Villars. Paris.

- LODKINA M.M. et DANILOVA M.F., 1975. Ultrastructure of <u>Triticum aestivum</u>
 L. pollen sac cells at early developmental stages.

 Bot. Zh., 60, 47-52.
- LOVE D., 1944 Cytogenetic studies on dioecious Melandrium. Botaniska. Notiser., 97, 1.25-214.
- LOVE A. and LOVE D., 1945. Experiment on the effects of animal sex hormones on dioecious plants. Arkiv. För. Botanik, 32 (1), 1,60.
- LOWRY O.H. ROSEBROUGH N.J. FARR. A.L. RANDALL R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol, Chem., 193, 265-275.
- MAGNIN A., 1888. Notes sur l'hermaphrodisme de <u>Lychnis dioica</u> atteint d'Ustilago. C.R. Acad. Sci. Paris, 107,663.
- MAHESHWARI P., 1934. Contribution to the morphology of some Indian Liliaceae. The gametophytes of <u>Ophiopogon wallichianus</u>.H. Proc. Indian. Acad. Sc. Sect. B., 1, 197-204.
- MAHESHWARI P., 1950. An introduction to the embryology of angiosperms.

 Mc Graw. Hill. Book. Company., 453 pages.
- MALIK M.M.S. et BATTS C.C.V., 1960. The infection of barley loose smut.

 <u>Ustilago nuda</u> (Jens). Trans. Br. Mycol. Soc., <u>43</u>, 117-125.
- MALIK M.M.S. and BATTS C.C.V., 1960. The development of loose smut

 (<u>Ustilago nuda</u>) in the barley plant with observations on spore
 formation in nature and in culture.

 Trans. Brit. mycol. Soc., <u>43</u>, 126-131.
- MANACHERE G., 1970. Recherches physiologiques sur la fructification de Coprinus congregatus Bull. et Tr. : action de la lumière, rythme de production des carpophores.

 Ann. des Sc. Nat. Bot. Paris, 11, 1-96.
- MANI M.S., 1964. The ecology of plant galls. The Hague: Dr. W. JUNK publishers.

- MARCHANT R., 1970. The fungi in Electron microscopy and plant ultrastructure. Edit. A.W. ROBARDS. Mc. GRAW HILL, New-York, 206,224.
- MARK W.K., COOK J.A., 1971. Arginine and total free amino acids as indicators of the nitrogen status of grapevines.

 J. Am. Soc. Hort. Sc., 96 (5), 581-587.
- MARTOJA R., MARTOJA M., 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie. Paris.
- MARTOJA R., 1977. Les organes génitaux femelles. In. Traité de Zoologie. Tome VIII. fasc. V.A. Masson et Cie. Paris, 1-123.
- MATILE Ph., 1975. The lytic compartment of plant cells. Springer. Verlag. 183 pages.
- MATSUDA H., 1936. The effect of abnormal temperature upon the pollen formation of Petunia. Jour. Coll. Agric., XIV, 71-92.
- McNEILL J. et CROMPTON C.W., 1978. Pollen dimorphism in <u>Silene alba</u>. Can. J. Bot., <u>56</u>, 1280-1286.
- MERIMOTO N. and ODA Y., 1974. Photo induced Karyogamy in a Basidiomycete Coprinus macrorhizus. Plant and Cell. Physiol., 15, 183-185.
- MESQUITA J.F., 1969. Electron microscope study of the origin and development of the vacuole in root-tip cells of <u>Lupinus albus</u>.L. J. Ultrastr. Res., 26, 242-250.
- MITTWOCH U., 1967. Sex chromosomes. Academic Press. New-York, London.
- MOREL G., 1948. Recherche sur la culture associée de parasites obligatoires et de tissus végétaux. Ann. epiphyt. N.S., 14, 123-234.
- MOORE S. et STEIN W., 1954. Procedures for the chromatographic determination of amino acids on four per cent cross linked sulfonated polystyrene resins. J. Biol. Chem., 211, 893-906.

- MURASHIGE T. et SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with <u>Tobacco</u> tissue cultures.

 Physiol. Plant., 15, 473-497.
- NIELSEN J., 1972. Isolation and culture of monokaryotic haplonts of <u>Ustilago tritici</u>, observations on their physiology and the taxonomic relation-ship between <u>U.tritici</u> and <u>U.nuda</u>.

 Can. J. Bot., <u>50</u>, 1775-1782.
- NIELSEN J., 1968. Isolation and culture of monokaryotic haplonts of

 <u>Ustilago nuda</u>, the role of proline in their metabolism, and the
 inoculation of barley with resynthesized dikaryons.

 Can. J. Bot., 46, 1193-1200.
- NIGTEVEGHT.VAN. F., 1966. Genetic studies in dioecious Melandrium.2. sex determination in Melandrium album and M.dioicum.

 Genetica., 37, 307-344.
- NOUGAREDE A., 1965.- Danstravaux dediés à L. PLANTEFOL., 171-340. Ed. Masson et Cie. Paris.
- NOVAT N., 1967. Production d'acide indolyl-acétique par quelques espèces d'Ustilago. C.R. Soc. Biol., 160 (7), 1414-1417.
- ORCIVAL J., 1969. Infrastructure des suçoirs et relations hôte-parasite dans des stades écidiens d'Uredinales. C.R. Acad. Sc. Paris, 269, 1973-1975.
- PAL. N., 1952. A contribution to the life histories of <u>Stellaria media</u> and <u>Polycarpon coeflingiae</u>. Proc. Nat. Inst. Sc. India. B., 18, 363-378.
- PARK P., TSUDA M., HAYASHI Y., UENO T., 1977. Effect of host-specific toxin (AM-TOXIN I) produced by <u>Alternaria mali</u>, an apple pathogene, on the ultrastructure membrane of cells in apple and Japanese pear leave. Can. J. Bot., 55, 2383-2393.
- PITT D. and COOMBES C., 1968. The disruption of lysosome like particles of Solanum tuberosum cells during infection by Phytophtora erythroseptica.P. J. Gen. Microbiol., 53, 197-204.

- PLANTEFOL L., 1962. Structure et fonctionnement du méristème terminal de la tige. Rapport introductif -. Mém. Soc. Bot. Fr., 3-14.
- POON H. and DAY A.W., 1974. "Fimbriae" in the fungus <u>Ustilago violacea</u>. Nat., <u>250</u> (5468), 648-649.
- POON N.H., MARTIN J. and DAY A.W., 1974. Conjugation in <u>Ustilago violacea</u>
 I. Morphology. Can. J. Microbiol., 20 (2), 187-191.
- POON H.N. and DAY A.W., 1975. Fungal fimbriae I. Structure, origin and synthesis. Can. J. Microb., 21 (4), 537-546.
- POON N.H., DAY A.W., 1974. Somatic nuclear division in the sporidia of <u>Ustilago violacea</u>. II. Observations on living cells with phase contrast and fluorescence microscopy.

 Can. J. Microbiol., 20 (5), 739-746.
- POON N.H. and DAY A.W., 1976. Somatic nuclear division in sporidia of <u>Ustilago violacea</u>. III. Ultrastructural observations. Can. J. Microb., 22 (4), 495-506.
- POON N.H. and DAY A.W., 1976. Somatic nuclear division in the sporidia of <u>Ustilago violacea</u>. IV. Microtubules and the spindle-pole body. Can. J. Microb., <u>22</u> (4), 507-522.
- POUX N., 1963. Sur la présence d'enclaves cytoplasmiques en voie de dégénérescence dans les vacuoles des cellules végétales.

 C.R. Acad. Sc. Paris, 257, 736-738.
- RADULESCUE and MUNTEANU I., 1966. Development of technique for the artificial inoculation of corn plants with <u>Ustilago maydis</u> (D.C.) Inst. Cercet. Agric. An., 4, 33-39.
- RAYNAL G., 1974. Une technique de contamination artificielle du maïs par <u>Ustilago maydis</u> (D.C.). Ann. phytopath., <u>6</u> (3), 353-357.
- REDDY M.N and RAO. A.S., 1975. Amino acids in mycelium and culture filtrates of <u>Rhizoctonia solani</u>. Trans. Br. mycol. Soc., 64 (3), 527-528.

- ROBB J., 1972. Ultrastructure of <u>Ustilago hordei</u>. Pregermination development of hydrating teliospores. Can. J. Bot., <u>50</u>, 1253-1261.
- ROBB J., BUSCH L., BRISSON D.J. and LU. B.C., 1977. Ultrastructure of wilt syndrome caused by <u>Verticillium dahliae</u>. III.

 Chronological symptom development in sunflower leaves.

 Can. J. Bot., <u>55</u>, 139-152.
- ROBINSON P.W. and HODGES C.F., 1973. Benomyl-induced growth of <u>Ustilago</u> striiformis in vitro. Phytopath., <u>63</u>, 1074-1075.
- ROHFRITSCH D., 1971. Infrastructure des cellules du tissu nourricier de la galle de <u>Geocrypta galli</u> H.Lw. sur <u>Gallium mollugo</u>.

 C.R. Acad. Sc. Paris, 272, 76-78.
- ROSENBERG O., 1901. Uber die embryologie von Zostera marina.L.B.T. K. Svenska. Vet. Akad. Handl., 27, 1-24.
- SABOURAUD., 1908. Ann. Dermatol.P.93 in Langeron: Précis de microscopie. Masson et Cie, 1934.
- SCANNERI S., BONFAUTE-FASOLO P., 1977. Unusual plastids in an endomycorrhizal root. Can. J. Bot., 55, 2471-2474.
- SCHEFFER R.P. and YODER O.C., 1972. Host specific toxins and selective toxicity. In. Phytotoxins in plant diseases.

 R.K.S. BALLIO and A. GRANITI. Ed. Acad. Press. London and New-York.
- SCHNEIDER A. et DARGENT R., 1977. Localisation et comportement du mycélium de <u>Taphrina deformans</u> dans le mésophylle et sous la cuticule des feuilles de pêcher (<u>Prunus persica</u>).

 Can. J. Bot., 55, 2485-2495.
- SCHOPFER W.H. et BLUMERS S., 1938. Les facteurs de croissance des espèces du genre Ustilago. C.R. Acad. Sc. Paris, 206, 1141-1143.

- SHAW M. and COLOTELO N., 1961. The physiology of host parasite relations. The effect of stem rust on the nitrogen and amino acids in wheat leaves. Can. J. Bot., 39, 1351-1372.
- SPENCER J.L. and WHITE H.E., 1951. Anther smut of carnation. Phytopath., 41, 291-299.
- STAINIER F.A., 1966. Observations préliminaires sur les effets du gamétocide. 2.3. dichloro-isobutyrate de sodium (F.W. 450) sur les cellules tapétales de <u>Spinacia oleracea</u>. C.R. Acad. Sc. Paris, 262, 2453-2455.
- STOUGHTON R.H., 1930. Thionin and orange G for the differential staining of bacteria and fungi in plant tissues. Annals of Applied Biology., 17 (1), 162-164.
- STRULLU D.G., GOURET J.P., 1974. Ultrastructure et évolution du champignon symbiotique des racines de <u>Dactylorchis maculata</u> L.V. J. Microsc. Paris, <u>20</u>, 285-294.
- STRULLU D.G., 1974.- Etude ultrastructurale du réseau de Hartig d'une ectomycorrhize à ascomycètes de <u>Pseudotsuga menziesii</u> (Mirb.) C.R.Acad. Sc. Paris, <u>278</u>, 2139-2142.
- THIERY J.P., 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. J. Microscop. Paris, 6, 987-1018.
- TOUSSOUN T.A. and WEINHOLD A.R., 1967. Light requirements and light inhibition of sexual reproduction in <u>Fusarium solani cucurbitae</u>, race II. Can. J. Bot., 45, 951-954.
- TUREL F.L.M., 1964. Saprophytic development of the flax rust Melampsora lini. race III. Can. J. Bot., 47, 821-823.
- TUTIN T.G., HEYWOOD V.H. BURGES N.A., VALENTINE D.H., WALTERS S.M. and WEBB D.A., 1964. FLORA EUROPAEA, 1, 174. Camb. Univ. Press.
- VAN ANDEL O.M., 1966.- In "Amino acids and plant diseases".

 Ann. Review of Phytopath., 4, 340-368.

- VANDERWALLE, R., 1942. Note sur la biologie d'<u>Ustilago nuda tritici</u>.
 Bull. Inst. Agron. Gembloux, 11, 103-113.
- VASIL K.J., 1973. The new biology of pollen. Naturwissenschaften, $\underline{60}$, 247-253.
- VEENENBOS J.A.J. and BRANDSMA T.W., 1957. Artificial contamination of oats with loose smut, <u>Ustilago avena</u> (Pers.) Jens. T. Planteziekt., 63 (6), 375-379.
- VENKATASUBBAN K.R., 1945. Cytological studies in Bignoniaceae. The cytology of <u>Dolichandrone rheedii</u>. (Seem) and allied genera. Proc. India. Acad. Sc. Sect. B, 21, 77-92.
- VIENNOT-BOURGIN, G., 1964. Systématique des champignons parasites des plantes. C.D.U. et S.E.D.E.S. réunis, 115-116, Paris.
- VIENNOT-BOURGIN G. 1965. Contribution à la connaissance des agents pathogènes des organes floraux, des fruits et des semences.

 Inst. Nat. Agro. Paris, 1-65.
- VIENNOT-BOURGIN G., 1949. Les champignons parasites des plantes cultivées.

 Masson et Cie. Paris.
- VIJAYA-KUMAR C.S.K. and RAO A.S., 1977. Amino acids in the mycelium and culture filtrate of <u>Alternaria solani</u>.

 Trans. Br. mycol. Soc., 69 (1), 153-154.
- VIJAYA-KUMAR C.S.K. and RAO A.S., 1976. Amino acids, organic acids and sugars present in mycelium of Alternaria triticina and A. tenuis.

 Trans. Br. mycol. Soc., 67 (3), 498-499.
- VUILLEMIN P., 1891. Notes sur les effets du parasitisme de l'<u>Ustilago</u>
 <u>antherarum</u>. C.R. Acad. Sc. Paris, <u>113</u>, 662-665.
- WANDERWALLE R., 1935. Bulletin de la classe des Sciences, 5ème sér., Acad. royale de Belgique., 21 (7), 759-765.

- WANDERWALLE R. et SOMMEREYNS G., 1965. Note sur l'inoculation artificielle d'<u>Ustilago</u>. Parasitica., <u>21</u> (1), 9-15.
- WANG D.T., 1934. Contribution à l'étude des Ustilaginales. Cytologie du parasite et pathologie de la cellule-hôte.

 Le Botaniste, <u>26</u>, 540-670.
- WANG D.T., 1932. Quelques observations sur l'<u>Ustilago violacea</u> (Pers.) Fruckel. C.R. Acad. Sc. Paris, 195, 1417-1418.
- WARMKE H.E., 1946. Sex determination and sex balance in Melandrium.

 Am. J. Bot., 33, 648-660.
- WELLENSIEK S.J., 1976. The influence of photoperiod and of G.A.₃ on flower development and stem elongation of <u>S. armeria</u> L. Kon. Ned. Akad. Wet. Amst. Série C, 1976 (1), 84-89.
- WERTH., 1913. In contribution à la connaissance des agents pathogènes des organes floraux, des fruits et des semences.

 VIENNOT-BOURGIN G. Inst. Nat. Agr. Paris, 1-65.
- WESTERGAARD M., 1953. Uber den mechanismus der Geschlechts. Bestimmung der <u>Melandrium album</u>. Naturwissenschaften, <u>40</u>, 253-260.
- WHITE J.A.O., CALVERT H. and BROWN M.F., 1973. Ultrastructural changes in corn leaves after inoculation with <u>Helminthosporium maydis</u>. race T. Phytopath., <u>63</u>, 296-300.
- WILLIAMS B.J. and BOONE D., 1963. <u>Venturia inaequalis</u>. Amino acids in relation to pathogenicity of two wild type lines to two apple varieties. Phytopath., <u>53</u>, 979-983.
- WILLIAMS P.G., SCOTT K.J., MUHL J.L. and MACLEAN D.T., 1967. Sporulation and pathogenicity of <u>Puccinia graminis</u>. sp. <u>tritici</u>, grown on an artificial media. Phytopath., 57, 326-327.
- WILMOT A. and MOORE P.D., 1973. Adaptation to light intensity in Silene alba and S.dioica.

 OIKOS., 24, 458-464.

- WOOD R.K.S., 1967. Physiological plant pathology. Botanical monographs.

 JAMES J.O. et BURNETT J.H.

 Ed. Blackwell Sc. Public. Oxford-Edinburg. 6, 570.
- ZAMBETTAKIS Ch., 1963. Les charbons du chiendent. Rev. de Mycol., 28 (5), 312-348.
- ZAMBETTAKIS Ch., 1970. Recherches sur les Ustilaginales d'Afrique. Bull. Soc. myc. Fr., <u>86</u> (2), 305-692.
- ZAMBETTAKIS Ch., 1973. Recherches sur la germination des téliospores des Ustilaginales. Bull. Soc. Myc. Fr., 89, 253-275.

PLANCHE I

CONJUGAISON DES SPORIDIES SECONDAIRES DE L'USTILAGO VIOLACEA ET FILAMENTS MYCELIENS ISSUS DES CONJUGAISONS.

Toutes les préparations ont été colorées au bleu lactique, sauf celle de la fig. 7 qui a été colorée par un réactif iodo-iodurée. Dans chaque micrographie, l'échelle représente $5~\mu m$.

Fig. I : Trois couples de sporidies conjuguées.

<u>Fig. 2 - 3 - 4</u>: Anomalies observées. La conjugaison ne se fait pas toujours entre deux sporidies compatibles.

Fig. 2 et 3 : groupe de trois sporidies conjuguées ;

Fig. 4 : groupe de cinq sporidies conjuguées.

Fig. 5 : Multiplication végétative par bourgeonnement des sporidies haploïdes : se présente sous forme de chapelet avant de se dissocier.

Fig. 6 et 7 : Emission de filaments à partir de sporidies haploïdes. Ceci s'observe lorsque deux sporidies compatibles sont peu rapprochées l'une de l'autre.

Fig. 8 : Emission d'un filament dicaryotique à partir de l'une des sporidies compatibles.

Fig. 9 : Le filament dicaryotique est émis à partir du pont liant les deux sporidies.

Fig. IO : Emission de sporidies à partir d'un mycélium dicaryotique.

Fig. II : Le mycélium est émis à partir de trois sporidies conjuguées.

Fig. I2 : L'une des sporidies vide son contenu dans la seconde, d'où est émis le mycélium dicaryotique.

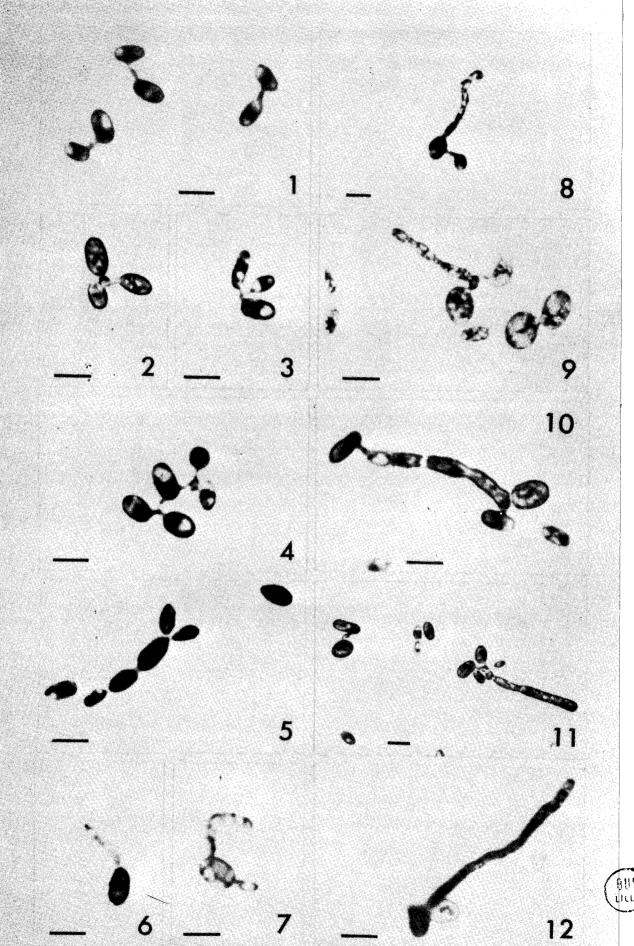


PLANCHE II

FLORAISON IN VITRO DE SILENE ALBA SAIN

- Fig. I, 2, 5: Fleurs mâles provenant de la culture in vitro des fragments de tige. Les fleurs peuvent apparaître après la néoformation de 2 à 3 entre-noeuds fig. 5. Elles peuvent aussi se former sans développement important de pédoncule (fig. 2) ou presque directement sur le noeud, fig. I.

 Le milieu de culture est celui de MURASHIGE et SKOOG à 2I + I°C et en lumière continue.
- Fig. 4 et 6 : Fleurs femelles parfaitement épanouies dans les mêmes conditions que ci-dessus.
- Fig. 3 : Fleurs femelles développées sur milieu de HELLEP.

 La tige néoformée est plus grêle et le nombre de fleurs est moins important.





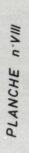
PLANCHE III

FLEURS MALES PARASITEES DE SILENE DIOICA

- Fig. I et 5 : Les anthères remplies de téliospores laissent échapper leur contenu sur le milieu gélosé.

 La germination de ses téliospores produit une masse blanchâtre (mélange de téliospores, de sporidies et de probasides).

 Les fleurs se développent à partir de tiges parasitées dans la nature.
- Fig. 2 et 3: Les fleurs se développent presque directement sur le noeud fig. 3, ou après la formation de 2 à 3 entrenoeuds fig. 2. Dans tous les cas, toutes ces fleurs sont charbonnées. Elles peuvent dépasser la dizaine par explantat (fig. 2).
- Fig. 4 et 6 : Explantats portant des fleurs parasitées après infection artificielle.



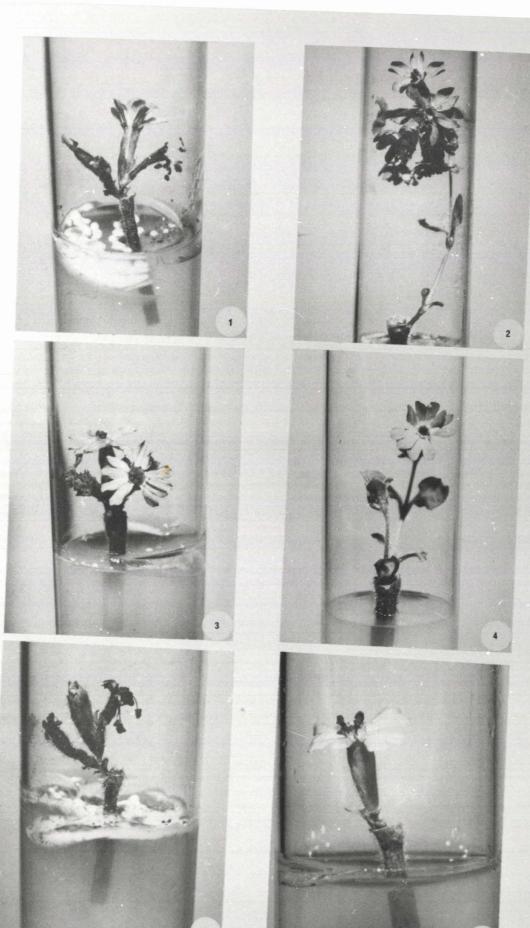
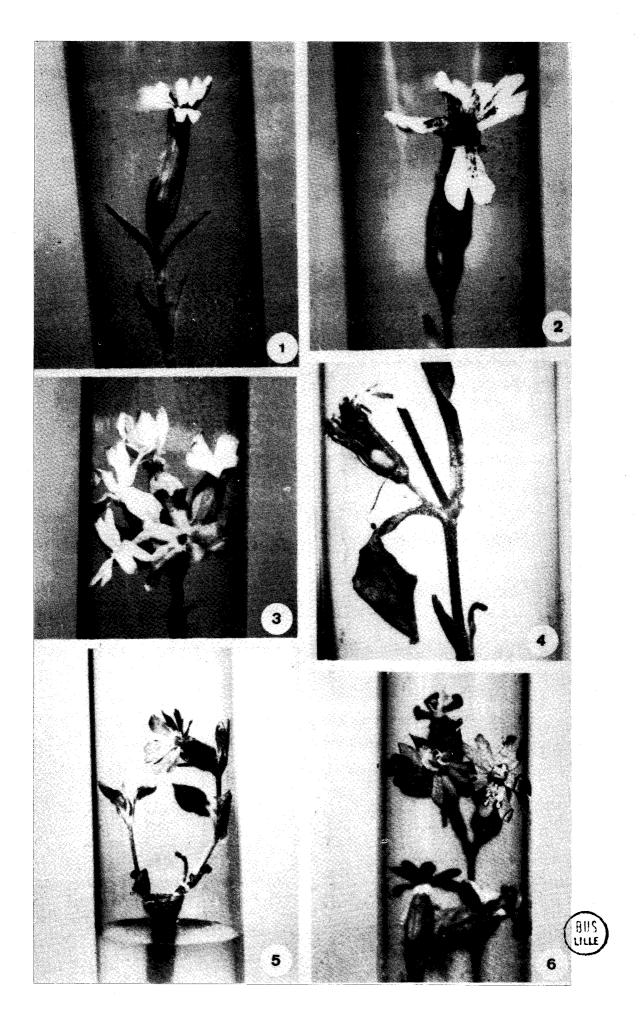




PLANCHE IV

FLEURS SAINES ET PARASITEES

- Fig. I : Silene alba. Fleur parasitée obtenue à partir de tiges infectées dans la nature.
- Fig. 2 : Fleur femelle de <u>Silene alba</u> artificiellement parasitée. Les téliospores de couleur noirâtre sont réparties sur les pétales et la paroi du tube de culture.
- Fig. 3 : Fleur femelle de Silene alba sain.
- Fig. 4 et 6 Silene dioica. Fleurs femelles parasitées obtenues à partir de tiges infectées dans la nature.
- Fig. 5 : Silene dioica. Fleurs mâles saines.



ABREVIATIONS UTILISEES DANS LES PLANCHES

V à VII

Ch. : chromosome

C.M. : cellule en mitose

C.Me. : cellule méristématique

C.N. : cellule nécrosée

D. : dictyosome

F.D. : feuille différenciée

F.J. : feuille jeune

L. : lipide

M. : mitochondrie

M.Ap. : méristème apical

M.Ax. : méristème axillaire

My. : mycélium

N. : noyau

n. : nucléole

P. : plaste

P.F. : primordium foliaire

P1. : plasmalemme

P.My. : paroi du mycélium

P.Sq. : paroi squelettique

R.E. : réticulum endoplasmique

T. : tige

y.C. : vaisseau conducteur

V.g. : vésicules golgiennes.

Le µm est l'unité de mesure,

ABREVIATIONS UTILISEES DANS LES PLANCHES

IX à XX

A.P. : assise pariétale C.F. : cellule du filet C.Sp. : cellule sporogène C.Sp.H. : cellules sporogènes hypertrophiées C.Sp.M. : cellule sporogène en mitose C.Sp.N. : cellule sporogène en nécrose Ch. : chromosome D. : dictyosome Ep. : épiderme L. : lipide Μ. : mitochondrie : massif sporogène M.Sp. Mb.N. : membrane nucléaire My. : mycélium N. : noyau : nucléole n. Ρ. : plaste P1. : plasmalemme P.My. : paroi du mycélium : paroi squelettique P.Sq. R.E. : réticulum endoplasmique

Le µmest l'unité de mesure.

: vacuole autophagique

: suçoir

: vacuole

: vésicule

: téliospore

S.

Τ.

V.

V.A.

Ve.

ABREVIATIONS UTILISEES DANS LES PLANCHES

XXXII à XXXVI

A. : amidon

A.P. : assises pariétales

C. : connectif

C.S. : cellules sporogènes

C.S.H. : cellule sporogène hypertrophiée

C.S.N. : cellule sporogène nécrosée

Ep. : épiderme

E.P. : épaississements pariétaux

F. : filet

G1. : glycogène

L. : lipides

M. : mitochondrie

My. : mycélium

M.S. : massif sporogène

N. : noyau
P. : plaste

P. My. : paroi mycélienne

P.S. : paroi squelettique

R.C.S. : reste de cellule sporogène

T. : tapis

t. : téliospore

V. : vacuole

Le µm est l'unité de mesure.

PLANCHE V

ASPECT GENERAL DE L'APEX ET CELLULES MERISTEMATIQUES SAINES.

TECHNIQUES : M.O. : semi-fine, bleu de toluidine basique : fig. I
M.E.T. : glut/OsO₄ ; fig. 2 : acétate d'uranyle et
citrate de plomb ; fig. 3 et 4 : THIERY.

Fig. I : Structure histologique d'un apex avec un primordium foliaire en cours d'élaboration.

Fig. 2 et 3 Cellules méristématiques, disposées de façon jointive avec de nombreuses mitochondries de taille réduite, et des plastes au stade de proplaste.

Fig. 4 : Détail d'une cellule méristématique, mettant en évidence quelques organites cellulaires, tels que mitochondries, plastes, dictyosomes, réticulum endoplasmique et noyau.

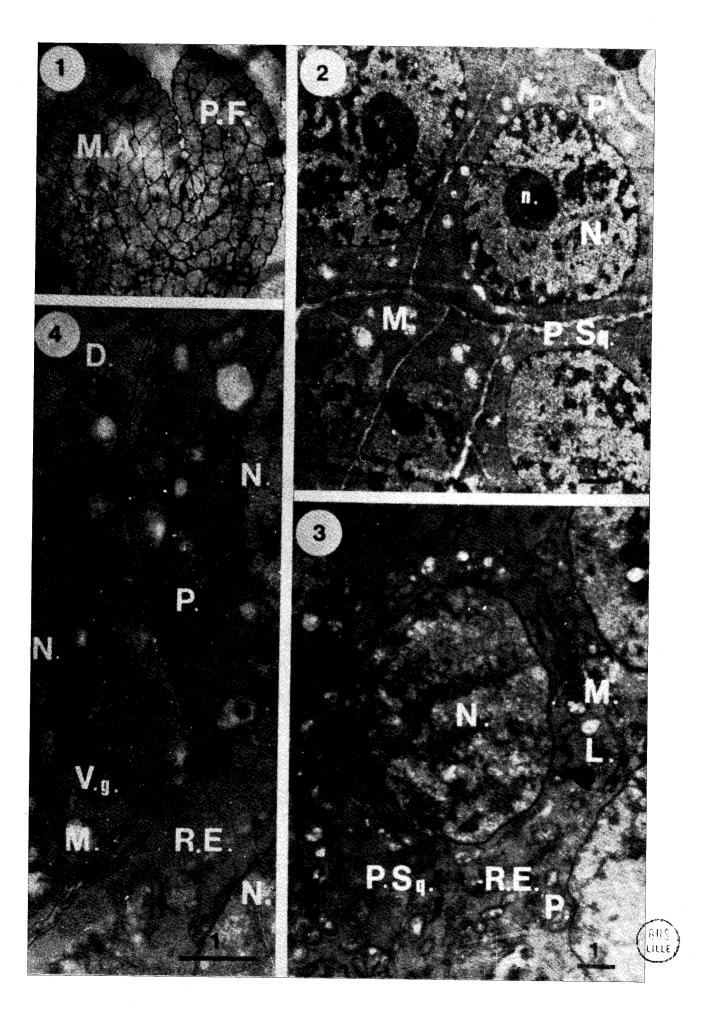


PLANCHE VI

APEX PARASITE

TECHNIOUES : M.E.T. : glut/0s04; fig. 5 et 6, THIERY.

- Fig. 5 : Sommet d'apex avec un mycélium situé directement sous les cellules épidermiques dont le nombre de gouttelettes lipidiques semble avoir augmenté.
- Fig. 6 : Aspect général d'un apex parasité. Certaines cellules méristématiques se divisent, tandis que d'autres se nécrosent.



PLANCHE VII

APEX PARASITE

TECHNIQUES: M.O. semi-fine, bleu de toluidine basique: fig. 8
M.E.T. glut/OsO₄; fig. 7, THIERY.

Fig. 7 : Mycélium entre deux cellules méristématiques dont les parois squelettiques au contact de celles du mycélium sont épaissies. De grosses gouttelettes lipidiques sont disposées le long de la paroi de la cellule hôte.

Fig. 8 : Vue générale d'un apex parasité. Le mycélium est visible aux angles des cellules.



PLANCHE VIII

FLEUR MALE SAINE (COLORATION A LA THIONINE) - M.O. -

- Fig. I a : Coupe transversale dans un bouton floral long de I,5 mm. Verticille interne des étamines (le verticille externe est situé à un niveau inférieur) (cf. Fig. 7 a). G : x 70.
- Fig. 2 a : Détail d'une anthère de la fig. I a : le tissu sporogène est en préméiose. G : x 280.
- Fig. 3 a : Coupe transversale dans un bouton floral long de I mm avec les anthères au stade méristématique : le verticille externe de cinq étamines forme des lobes saillants qui se détachent de l'axe, le verticille interne est encore confondu avec cet axe. G: x IOO.
- Fig. 4 a : Détail d'un lobe d'anthère du verticille externe (cf. fig. 3 a). G : x IIOO.
- Fig. 5 a : Détail du sac pollinique correspondant aux fig. I a et 2 a : le tapis se distingue nettement du tissu sporogène, les quatre assises de la paroi du sac pollinique sont indifférenciées. G : x 500.
- Fig. 6 a : Coupe longitudinale dans un bouton floral long de I,5 mm (cf. fig. I a) montrant l'axe faisant saillie dans la fleur. La coupe se situe dans le plan de deux étamines du verticille interne et de deux pétales. G : x 70.
- Fig. 7 a : Coupe longitudinale dans un bouton floral long de 2,5 mm montrant les anthères au stade de méiose; les anthères du verticille interne sont situées au-dessus de celles du verticille externe.

 G: x30.
- Fig. 8 a : Coupe oblique dans un sac pollinique au stade de Tétrade ; le tapis coloré en rose présente une réaction métachromatique à la thionine. G : x 300.
- Fig. 9 a : Détail d'un sac pollinique contenant du pollen jeune au stade de vacuolisation ; le tapis se dégénère, l'assise mécanique est différenciée. G : x 600.
- Fig. IO a : Grain de pollen adulte, sphérique, multiporé (sur la demi-sphère, on remarque huit pores germinatifs). G : x 500.
- Fig. II a : Population pollinique homogène avec quelques grains vides par léthalité accidentelle (coloration au carmin acétique ferrique). G:x I50.

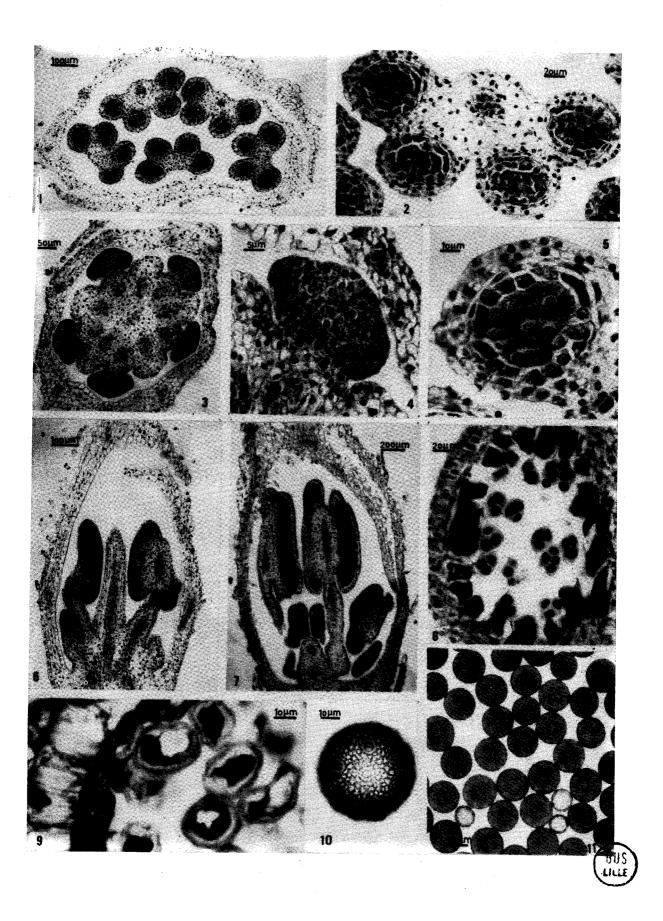


PLANCHE IX

HISTOLOGIE ET CYTOLOGIE ULTRASTRUCTURALE D'UNE ANTHERE SAINE.

TECHNIQUES: M.O. semi-fine, bleu de toluidine basique: fig. I

M.E.T.: glut/0s04: fig. 2, THIERY; fig. 3:

acétate d'uranyle et citrate de plomb.

Fig. I (x 750) : Coupe d'une jeune anthère composée d'un épiderme, de trois assises pariétales et d'un massif sporogène central. Une cellule sporogène se nécrose (flèche).

Fig. 2 (x II.600) : Aspect infrastructural d'une cellule pariétale.

<u>Fig. 3</u> (x II.600) : Aspect infrastructural de cellules sporogènes.

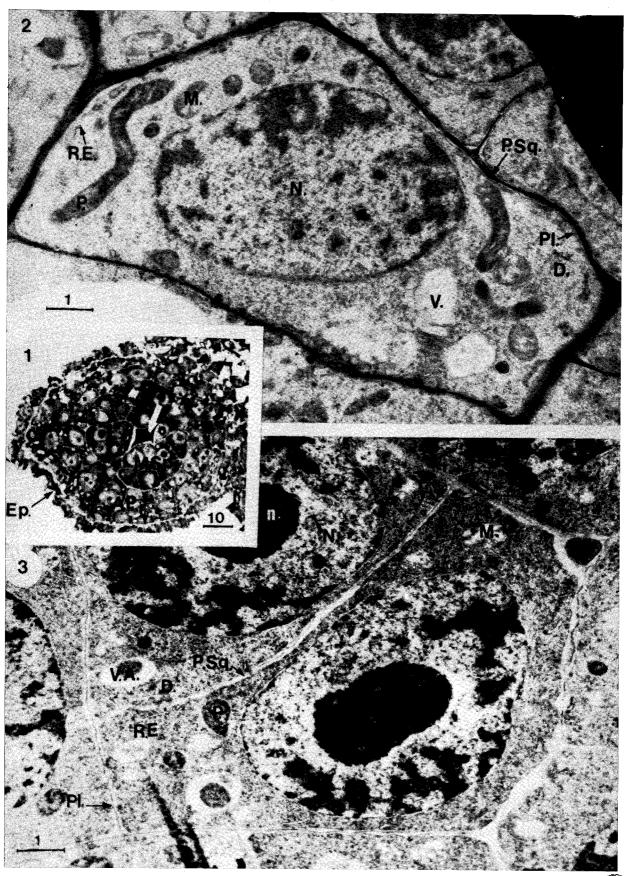


PLANCHE X

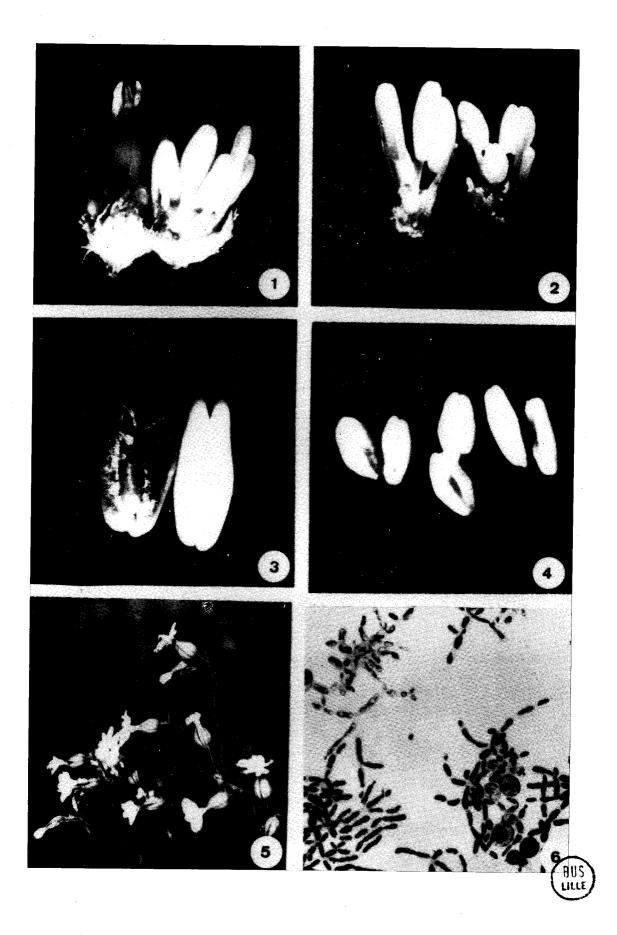
MODIFICATIONS DE LA MORPHOLOGIE DES FLEURS MALFS ET FEMFLLES DE SILENE DIOICA SAIN ET PARASITE PAR USTILAGO VIOLACEA.

Fig. I : Fleur femelle saine à gauche. Ovaire normalement développé. Il n'y a pas d'étamine. Les ébauches de ces dernières ont régressé progressivement au cours du développement de l'ovaire, et disparaissent complètement à ce stade.

A droite, fleur femelle parasitée par <u>Ustilago</u>
<u>violacea</u>. L'ovaire atrophié est entouré d'étamines
apparamment normales. La fleur prend une allure
hermaphrodite.

- Fig. 2 : Fleur mâle saine à gauche, et fleur mâle parasitée à droite : à ce stade, il n'y a pas de différence en dehors de la forme allongée des anthères saines.
- Fig. 3 : Anthère parasitée (à gauche) peu avant la libération des téliospores : elle prend une teinte violacée.

 A droite, une anthère saine au même stade ; elle est remplie de grains de pollen.
- Fig. 4 : A droite, deux anthères saines. Au centre, deux anthères parasitées provenant d'une fleur mâle et, à gauche, deux anthères parasitées provenant d'une fleur femelle. Les deux derniers couples se ressemblent, les anthères saines sont plus allongées.
- Fig. 5: Fleurs femelles saines dans la nature. La plante peut atteindre 80 cm de hauteur.
- Fig. 6 : Souche haploïde d'<u>Ustilago violacea</u> provenant de la mycothèque de BAARN (Hollande). Ici, elle se présente sous forme mycélienne et sous forme enkystée.



FLEURS MALES PARASITEES

Coloration thionine Fig. I b à 7 b - M.O.

- Fig. I b : Coupe transversale de l'anthère d'un bouton floral long de I,5 mm montrant le tissu sporogène à réaction métachromatique dense, indiquant le début du parasitisme. G : x 216.
- Fig. 2 b : Détail du sac pollinique antérieur gauche de l'anthère précédente : certaines cellules sporogènes présentent une réaction métachromatique dense. L'assise ceinturant le tissu sporogène n'est pas différenciée en tapis. G : x 500.
- Fig. 3 b

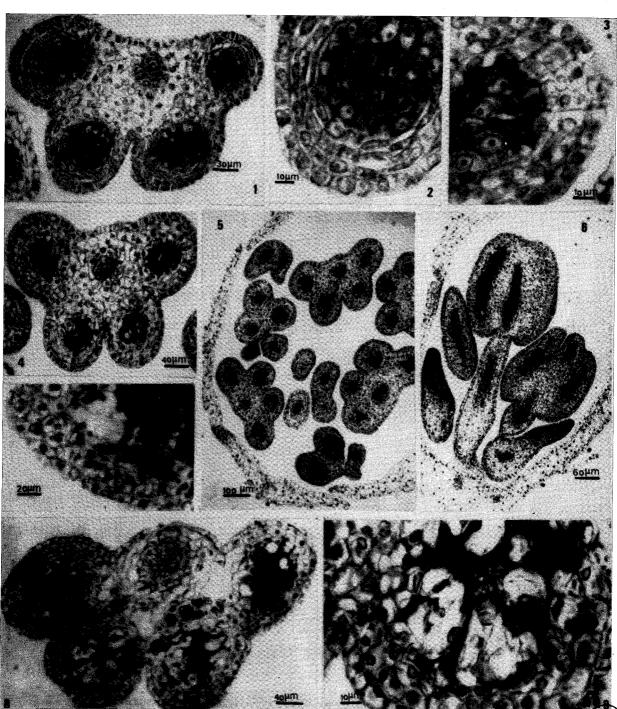
 : Coupe transversale dans le sac pollinique d'une anthère au stade de tissu sporogène (bouton floral de 2 mm) : l'assise périphérique du tissu n'est pas différenciée en tapis ; elle est totalement nécrosée. Les cellules centrales sont parasitées au niveau de la paroi ; deux cellules sont apparemment indemnes. G : x 500.
- Fig. 4 b : Coupe transversale d'une anthère parasitée provenant d'un bouton floral de 2,5 mm de long. G : x I62.
- Fig. 5 b : Coupe transversale d'un bouton floral long de 2,5 mm : le parasite envahit le tissu sporogène de tous les sacs polliniques. G : x 70.
- Fig. 6 b : Coupe longitudinale d'un bouton floral long de 3 mm. Le parasite commence à sporuler dans le sac pollinique. G : x IO8.
- Fig. 7 b : Coupe transversale d'un sac pollinique dont le parasite localisé à l'emplacement du tissu sporogène sporule. G : x 300.

Coloration au vert de méthyl-pyronine - Fig. 8 b et 9 b - M.O.

- Fig. 8 b

 : Coupe transversale d'une anthère parasitée provenant d'un bouton floral long de 2,5 mm (fig. 4 b). Entre les cellules parasitées, subsistent des cellules hypertrophiées. Dans les tissus du connectif, on observe des cellules contenant des cristaux d'oxalate de calcium.

 G: x 175.
- Fig. 9 b : Détail du sac pollinique antérieur gauche de l'anthère de la fig. 8 b. Les cellules hypertrophiées à grande vacuole ont réduit le volume des cellules nécrosées. G : x 550.



BUS LILLE

PLANCHE XII

APPARITION DU MYCELIUM DANS LES TISSUS D'UNE AMTHÈRE PARASITEE.

TECHNIQUES: M.O. semi-fine, bleu de toluidine, fig. 4

M.E.T. : $glut/0s0_{L}$; fig. 5-6 THIERY :

fig. 7; acétate d'uranyle et citrate de plomb

Fig. 4 (x I.500) : Coupe histologique d'une jeune anthère au début de l'implantation du mycélium. Le mycélium est pratiquement invisible.

Fig. 5 (x 5.000) : Cellule pariétale et mycélium. On peut noter la présence de vacuoles autophagiques.

Fig. 6 (x 4.000) : Mycélium au niveau des cellules sporogènes.

Tout le massif est envahi par le parasite
qui se localise surtout au niveau des méats.

Fig. 7 (x I5.600) : Epaississement de la paroi squelettique des cellules sporogènes au contact de la paroi du mycélium (flèche double).

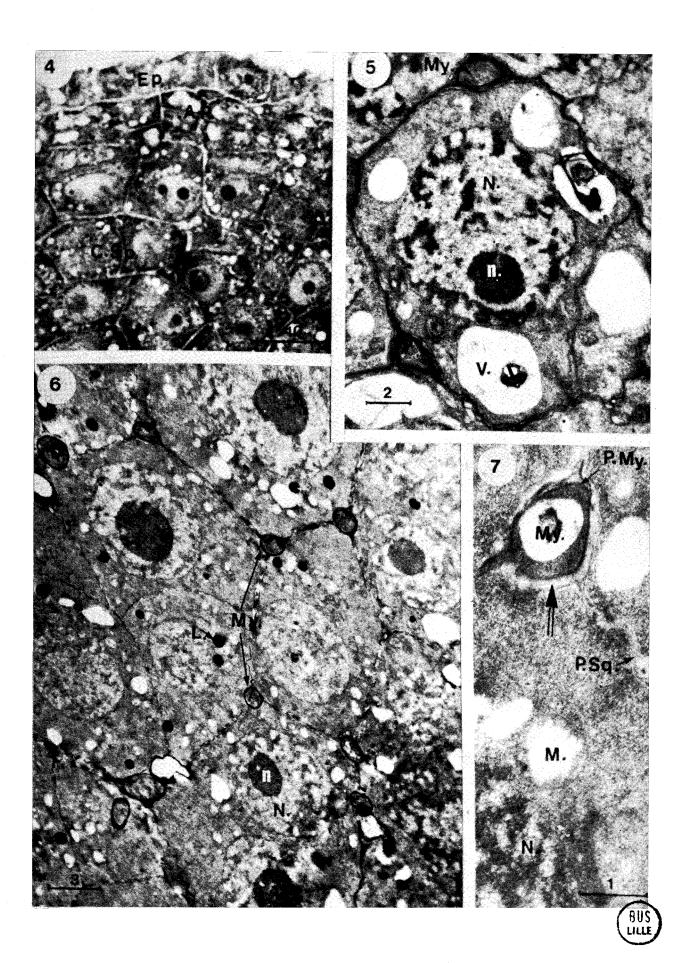


PLANCHE XIII

ANTHERE PAPASITEE. NECROSE PONCTUELLE AU SEIN DU MASSIF SPOROGENE.

TECHNIOUES: M.O. semi-fine, bleu de toluidine basique. - Fig. 8
M.E.T.: glut/0s04, acétate d'uranyle et citrate
de plomb. Fig. 9 - IO - II.

Fig. 8 (x I,500) : Coupe histologique d'une jeune anthère dont quelques cellules sporogènes éparses se nécrosent (flèche).

Fig. 9 (x 4.500) : Cellules sporogènes en début de nécrose.

Des hyphes cotoient ces cellules.

Fig. 10 (x 9.000) : Cellules sporogènes dont le protoplasme est déjà fortement détruit.

Fig. II (x 9.000) : Aspect final de la nécrose d'une cellule sporogène. Le mycélium est en contact avec le protoplasme nécrosé.

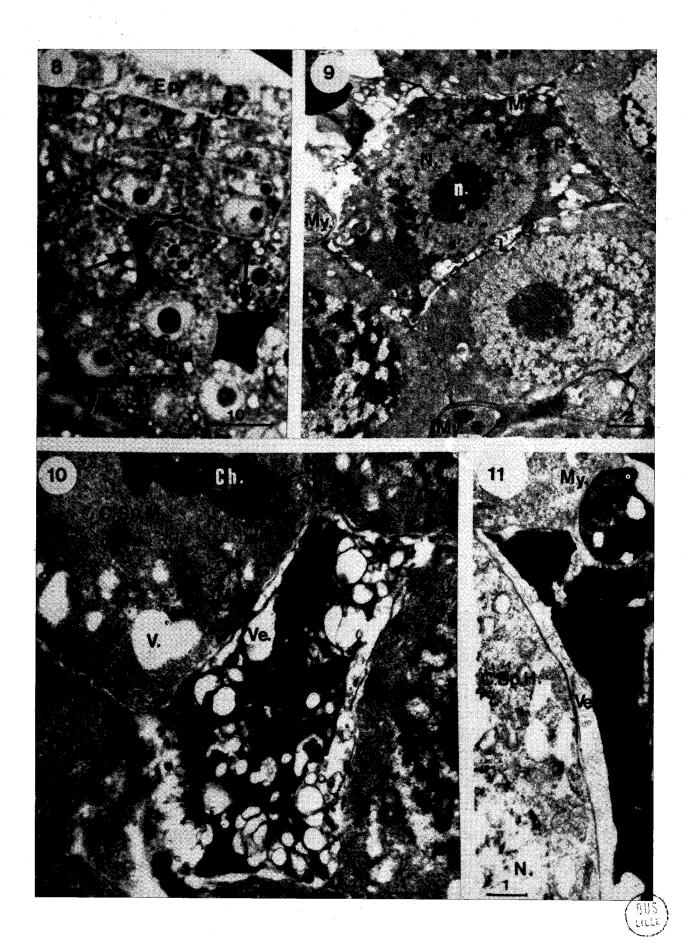


PLANCHE XIV

ANTHERE PARASITEE. EXTENSION DU PHENOMENE NECROTIQUE A L'ENSEMBLE DU MASSIF SPOROGENE.

TECHNIQUES : M.O. semi-fine, bleu de toluidine - Fig. I2
M.E.T. : glut/OsO₄ - Fig. I3-I4, THIERY.

Fig. I2 (x I.500) : Coupe histologique montrant l'extension de la nécrose des cellules sporogènes (flèches). On peut noter la présence de cellules hypertrophiées au voisinage des cellules nécrosées.

Fig. 13 (x 18.000) : Cellules sporogènes. Les mitochondries ont un stroma très éclairci et de rares crêtes.

Fig. 14 (x 5.000) : Cellules pariétales apparemment nonaffectées par la présence du mycélium.

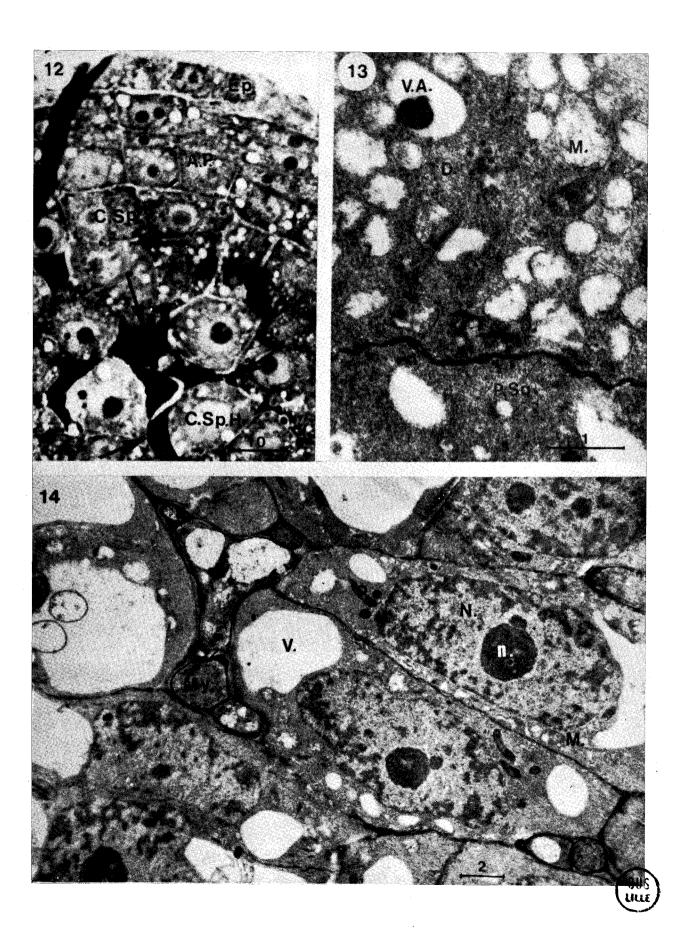


PLANCHE XV

ANTHERE PARASITEE, EXTENSION DU PHENOMENE NECROTIQUE A L'ENSEMBLE DU MASSIF SPOROGENE.

TECHNIQUES : Glut/OsO4 - Fig. I5 et I6, THIERY.

Fig. 15 (x 4.000) : Aspect général des cellules sporogènes nécrosées et en cours d'hypertrophie.

La présence de nombreuses vacuoles dans le cytoplasme des cellules voisines des cellules nécrosées est caractéristique.

Fig. 16 (x 18.000): Contact entre les cellules sporogènes nécrosées et hypertrophiées. Les parois et les plasmalemmes sont apparemment normaux.

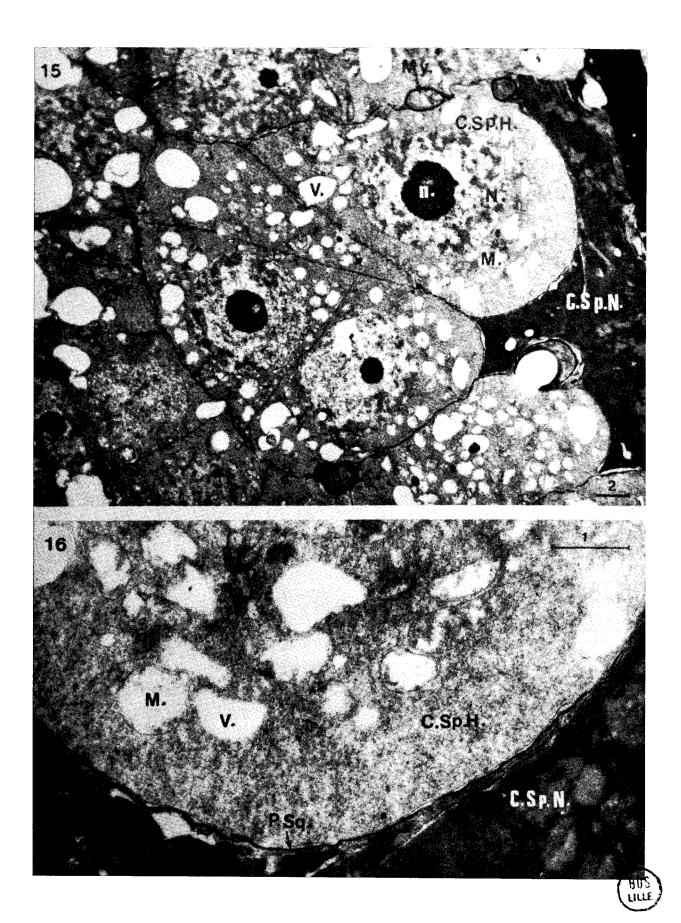


PLANCHE XVI

ANTHERE PARASITEE. EXTENSION DU PHENOMENE NECROTIQUE A L'ENSEMBLE DU MASSIF SPOROGENE.

- TECHNIQUES: M.O. semi-fine, bleu de toluidine basique Fig. 17

 M.E.T.: glut/OsO₄ Fig. 18 et 19, acétate d'uranyle et citrate de plomb.
- Fig. 17 (x 750) : Coupe histologique montrant le développement de la nécrose des cellules sporogènes.
- Fig. 18 (x 6.000) : Cellules sporogènes hypertrophiées au voisinage de cellules nécrosées. Elle est entourée de nombreux hyphes dont l'un émet un suçoir pénétrant dans la cellule.
- Fig. 19 (x 22.000) : Détail du suçoir. La paroi squelettique de la cellule sporogène a disparu à l'apex du suçoir (flèche double).

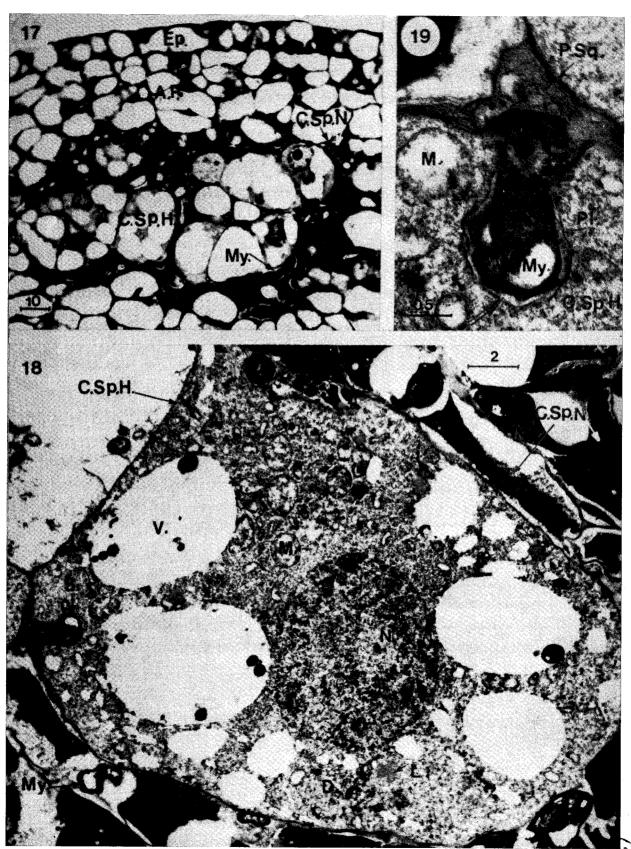


PLANCHE XVII

ANTHERE PARASITEE. EXTENSION DU PHENOMENE NECROTIQUE A L'ENSEMBLE DU MASSIF SPOROGENE.

- TECHNIOUES : M.E.T. : $g1ut/OsO_4$ Fig. 20 : THIERY Fig. 2I 22 23 : acétate d'uranyle et citrate de plomb.
- Fig. 20 : une étape de la dégradation du noyau et du cytoplasme des cellules sporogènes hypertrophiées. On assiste à une dilatation du réticulum endoplasmique, et à l'apparition de grandes vacuoles.
- Fig. 2I : Début de nécrose du noyau dont la forme circulaire est encore conservée, mais dont la densification du nucléoplasme est anormale. Présence de larges plages claires dans le cytoplasme.
- Fig. 22 : Cytoplasme occupé par d'énormes vacuoles.

 Dégradation accélérée de l'enveloppe nucléaire

 (flèche). Modification de la morphologie du noyau
 qui prend une forme allongée.
- Fig. 23 : Nécrose du noyau. Le nucléole disparaît et le nucléoplasme est, à certains endroits, en contact avec le hyaloplasme, après la disparition de l'enveloppe nucléaire. Il prend une forme irrégulière qui se réduit progressivement.

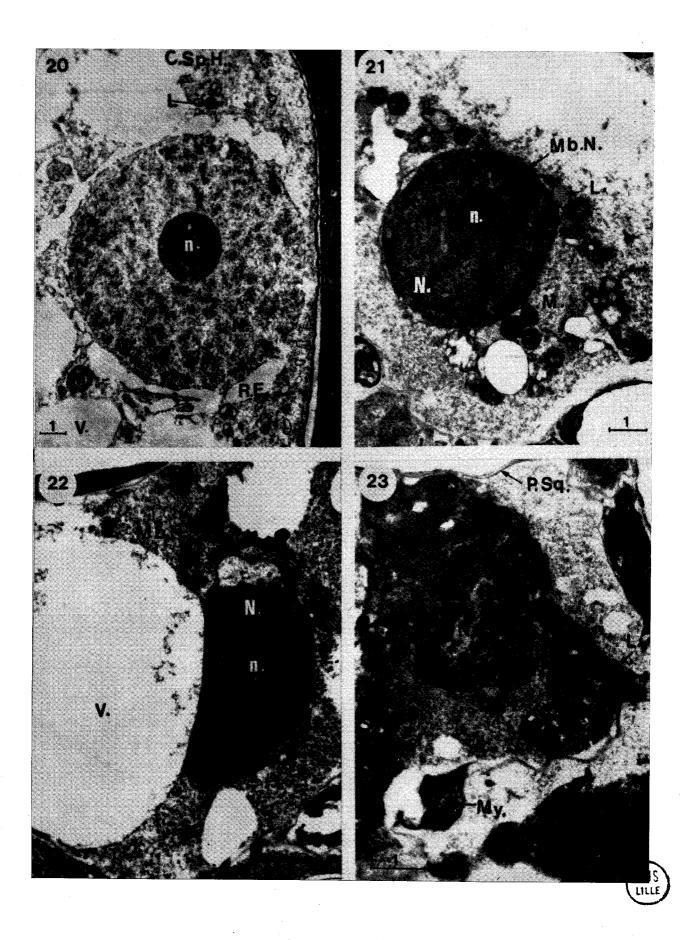


PLANCHE XVIII

ANTHERE PARASITEE. EXTENSION DU PHENOMENE NECROTIQUE A L'ENSEMBLE DU MASSIF SPOROGENE.

TECHNIQUES: M.O. semi-fine, bleu de toluidine basique; fig. 24
M.E.T.: glut/OsO₄ - Fig. 25-26: acétate d'uranyle
et citrate de plomb.

Fig. 24 (x I.500) : Coupe histologique. Cellules sporogènes hypertrophiées, entourées de cellules sporogènes nécrosées.

Fig. 25 (x I5.600) : Cellules sporogènes hypertrophiées.

Mitochondries et lipides.

Fig. 26 (x 6.000) : Relation entre cellules sporogènes nécrosées et cellules sporogènes hypertrophiées.

Les premières sont écrasées par les dernières.

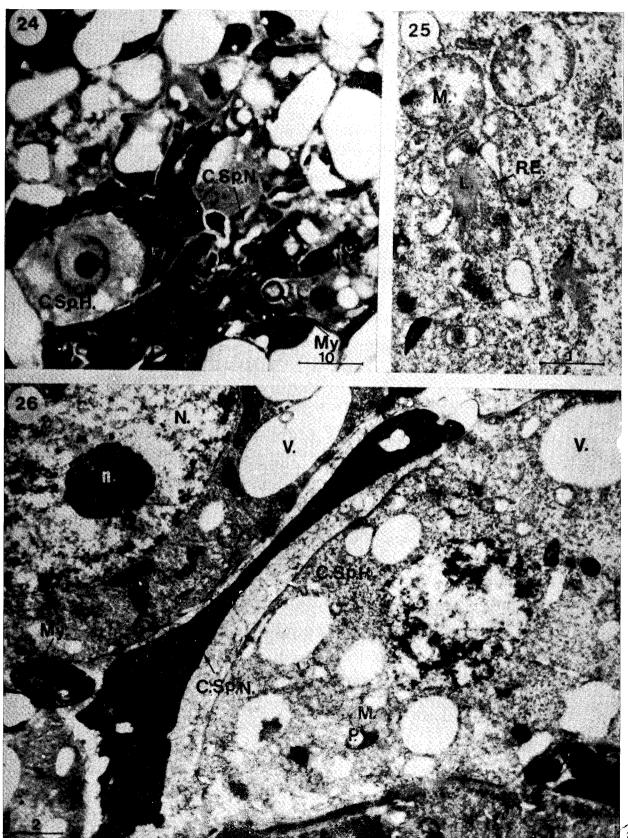


PLANCHE XIX

ANTHERE PARASITEE. INVASION DE LA CAVITE SPORANGIALE PAR LES HYPHES DU PARASITE.

- TECHNIOUES: M.O. semi-fine, bleu de toluidine basique: fig. 27.

 M.E.T: glut/0s04 acétate d'uranyle et citrate
 de plomb. Fig. 28-29.
- Fig. 27 (x 750) : Coupe histologique montrant l'envahissement de la zone nécrosée par les hyphes du parasite. Toutes les cellules sporogènes sont atteintes pendant que les cellules pariétales sont vacuolisées.
- Fig. 28 (x 4.000) : Prolifération du mycélium qui prend progressivement la place des cellules sporogènes détruites et digérées par le parasite.
- Fig. 29 (x 8,000) : Cellules sporogènes nécrosées et mycélium.

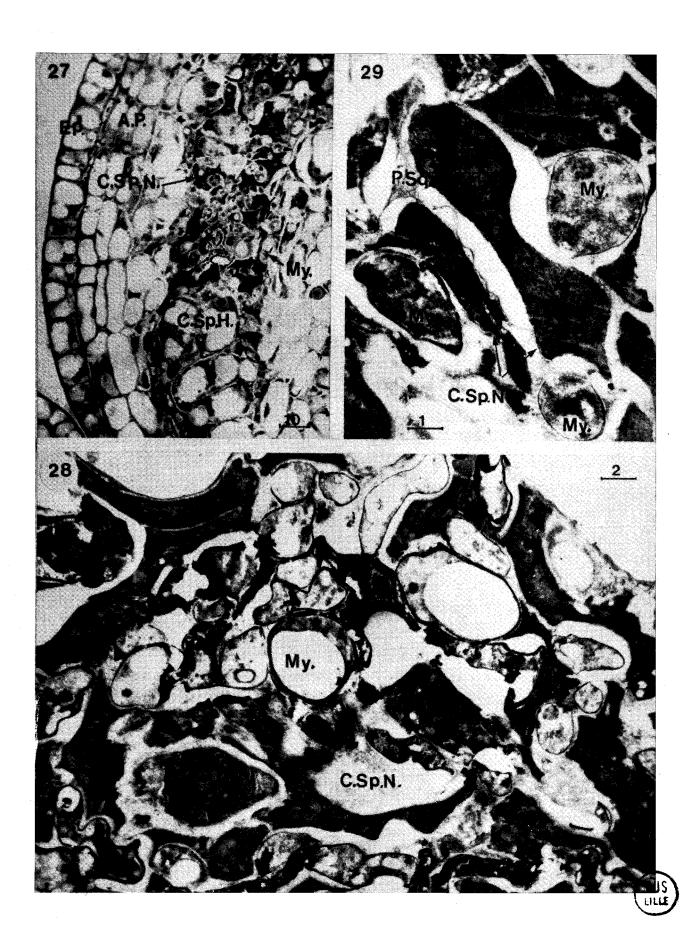


PLANCHE XX

ANTHERE PARASITEE (SPORULATION) ET MYCELIUM DAMS LE FILET DE L'ETAMINE.

- TECHNIQUES: M.O. semi-fine, bleu de toluidine basique: fig. 30

 M.E.T. glut/0s04. Fig. 31: acétate d'uranyle et citrate de plomb. Fig. 32, 33, 34: THIERY.
- Fig. 30 (x 750) : Coupe histologique montrant la sporulation dans la cavité sporangiale.
- Fig. 31 (x 17.600) : Téliospores et reste de cellules sporogènes nécrosée.
- Fig. 32 (x 19.200): Mycélium dicaryotique. Les deux noyaux sont visibles avec des mitochondries et des gouttelettes osmophiles.
- <u>Fig. 33-34</u> (x II.800 et 8.000) : Cellules mycéliennes.

 Le cytoplasme, riche en ribosomes, est fortement vacuolisé.

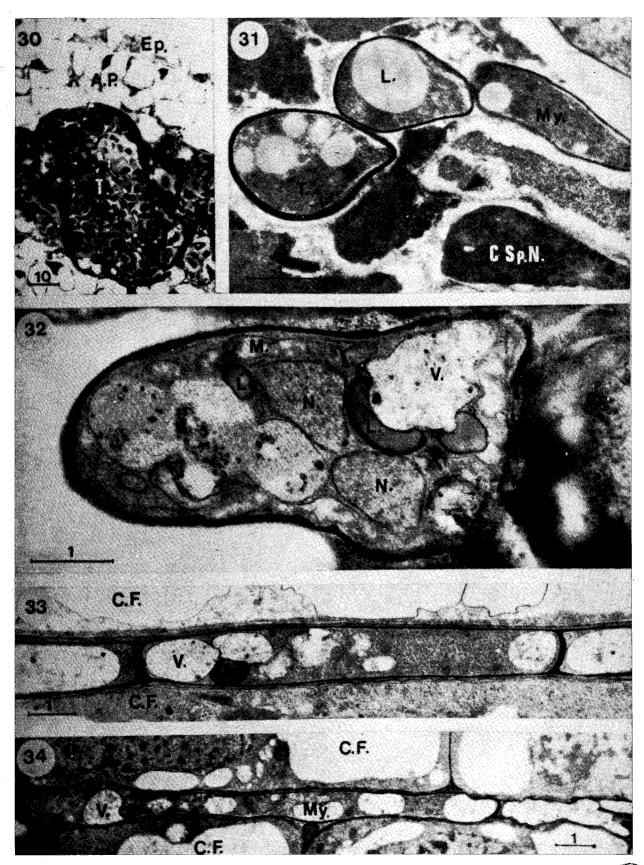


PLANCHE XXI

FLEURS FEMELLES SAINES ET PARASITEES Coloration à la thionine M.O.

I - FLEURS FEMELLES SAINES (Fig. I C et 2 C):

- Fig. I C

 : Coupe transversale dans le bouton floral long de 2 mm, montrant les deux verticilles d'étamines au stade méristématique avec, au centre, le méristème de l'ovaire. G : x 70.
- Eig. 2 C: Coupe transversale dans un jeune ovaire provenant d'un bouton floral de 4 mm : les loges carpellaires sont formées, le bord des feuilles carpellaires replié, donnant les lobes des futures ovules.

 Les initiums d'anthères observés sur la figure I C ont disparu. G: x 70.

II - FLEURS FEMELLES PARASITEES (Fig. 3 C à 13) :

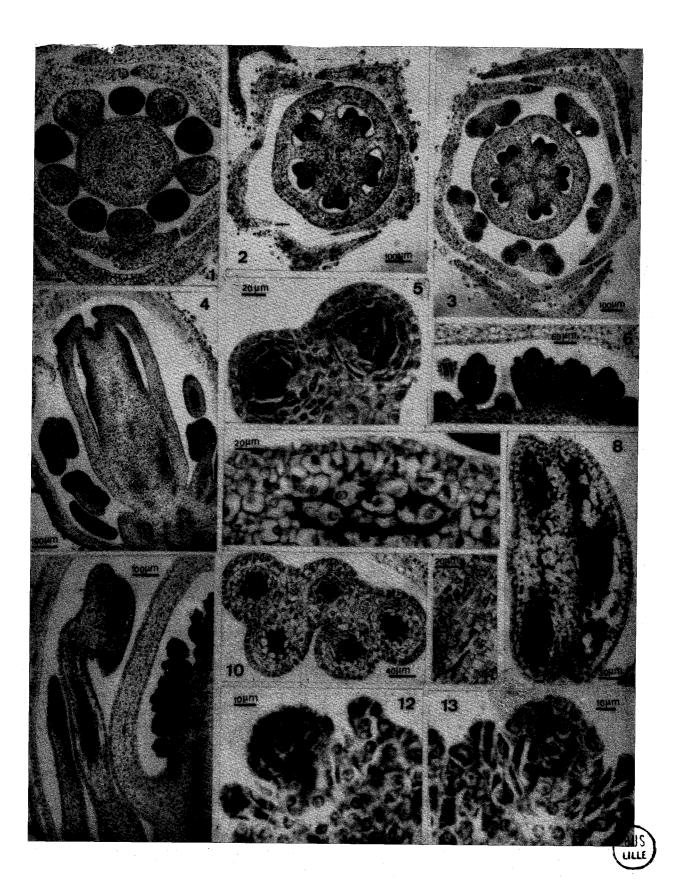
- Fig. 3 C

 : Coupe transversale dans un bouton floral long de 3 mm porté par une plante parasitée : l'ovaire est au même stade que celui du bouton floral de la figure 2 C : il est entouré du verticille interne d'étamines. G : x 60.
- Eig. 4 C: Coupe longitudinale dans un bouton floral au même stade que le précédant, montrant les deux verticilles d'étamines. Le verticille interne à anthères plus hautes : l'ovaire porté par le plateau axial et la colonne placentaire est limitée vers l'intérieur de la loge par deux assises cellulaires méristématiques, qui sont les initiums des ovules. G: x 65.
- Fig. 5 C : Coupe transversale dans un sac pollinique semblable à un sac pollinique de fleur mâle parasitée : le tissu sporogène est intensément coloré par métachromasie indiquant l'action du parasite.

 L'assise tapétale n'est pas différenciée.

 G : x 300.
- Fig. 6 C : Placenta avec ovules en voie de différenciation et provenant d'une fleur ouverte. G : x IOO.
- Fig. 7 C

 : Coupe tangentielle dans la paroi d'un sac pollinique au stade de sporulation, comme dans la figure 8 C : la coupe se situe au niveau de l'assise sous épidermique (l'assise mécanique pour une anthère saine) montrant le parasite au stade mycélien progressant dans les parois cellulosiques. G : x 375.



.../...

- Fig. 8 C : Coupe longitudinale dans la loge pollinique parasitée au stade de sporulation. La lumière des deux sacs polliniques est occupée par les futurs téliospores. Les assises internes de la paroi sont détruites. Il ne reste que les deux assises externes. L'épiderme et l'endothécium. G : x 200.
- Fig. 9 C : Coupe longitudinale dans le bouton floral parasité. Le parasite sporule dans l'anthère et il est au stade végétatif dans les ovules (cf. Fig. I2 C -I3 C). G : x 70.
- Fig.IO C : Coupe transversale d'une anthère d'un bouton floral de 2 mm de long ; les quatre sacs polliniques sont envahis par le parasite au niveau du tissu sporogène. G : x I75.
- Fig.II C : Détail du tissu du filet avec le parasite en position intercellulaire entre les parois cellulosiques. G : x 300.
- Fig.I2 C : Ovule réduit au nucelle et au méiocyte parasité au niveau de la paroi. Le tégument est au stade de digitation latérale du placenta. G : x 550.
- Fig. I3 C : Coupe passant par plusieurs méiocytes dont un seul est parasité. G : x 500.

PLANCHE XXII

OVULES NON PARASITES

TECHNIQUES : M.O. : semi-fine, thionine ; fig. I

M.E.T. : glut/OsO₄ - KMnO₄ ; fig. 2.

Fig. I : Vue en coupe des différents constituants tissulaires d'un ovule : tégument externe, tégument interne, nucelle.

Fig. 2 : Cellule du nucelle contenant de nombreux plastes et mitochondries. Le noyau occupe plus de la moitié du cytoplasme.



PLANCHE XXIII

JEUNES OVULES PARASITES

TECHNIQUES: M.O.: semi-fine, thionine fig. 3

M.E.T. : $glut/OsO_4$ - THIERY, 4

Fig. 3 : Coupe histologique du nucelle. Le mycélium est

situé au niveau des méats cellulaires (flèches).

Fig. 4 : Nucelle, Certaines cellules du nucelle possèdent

des vacuoles du type autophagiques. Le mycélium

est abondant (flèche).

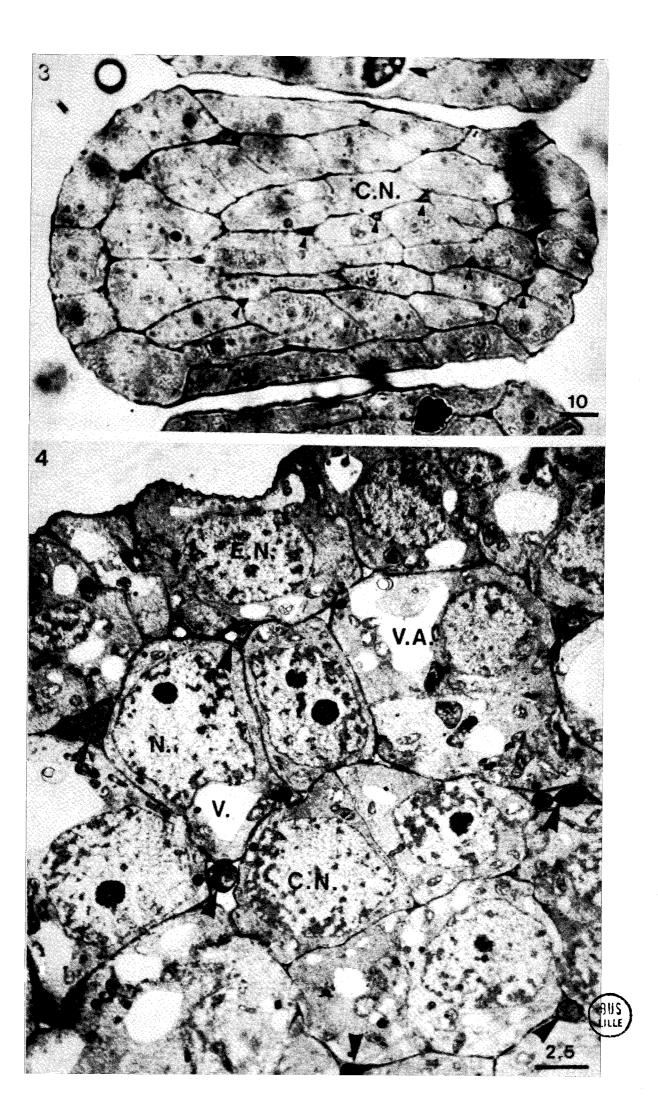


PLANCHE XXIV

JEUNES OVULES PARASITES

TECHNIQUES : M.E.T. : glut/OsO₄ - THIERY, fig. 5.

Fig. 5 : Nucelle. Malgré la présence du mycélium, les cellules nucellaires ont une infrastructure normale. Plastes, mitochondries, golgi, réticulum

endoplasmique, etc...

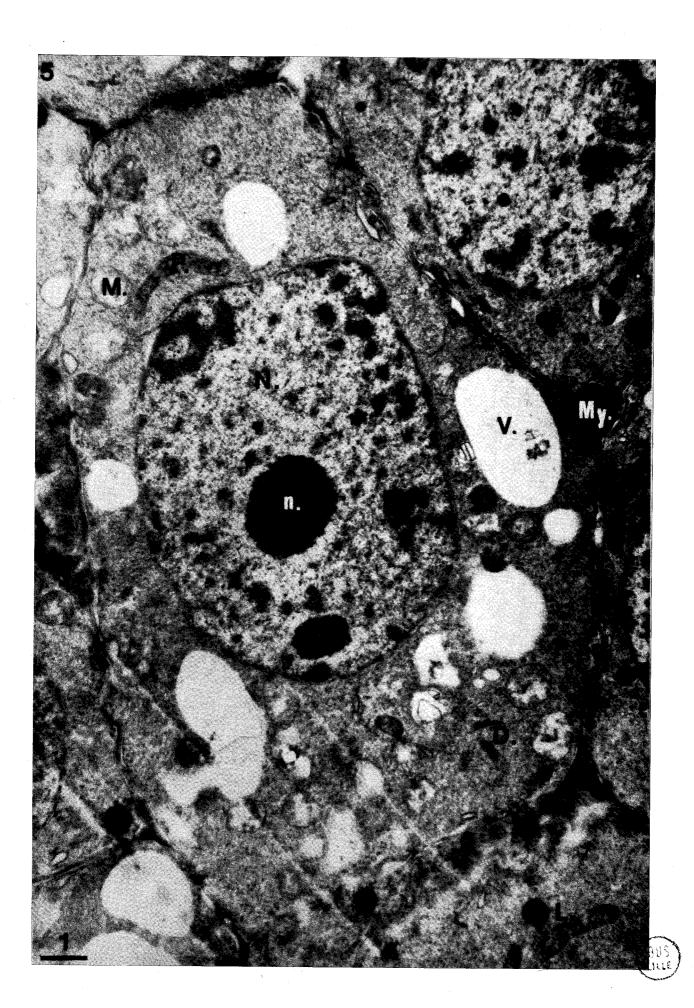


PLANCHE XXV

JEUNE OVULE PARASITE

TECHNIQUES : M.E.T. : glut/OsO₄ - THIERY, fig. 6.

Fig. 6 : Nucelle. Mycélium séparant des cellules voisines.

On le retrouve dès la première couche cellulaire externe. Le nucelle est ici dépourvu des téguments (qui ne sont pas encore formés).

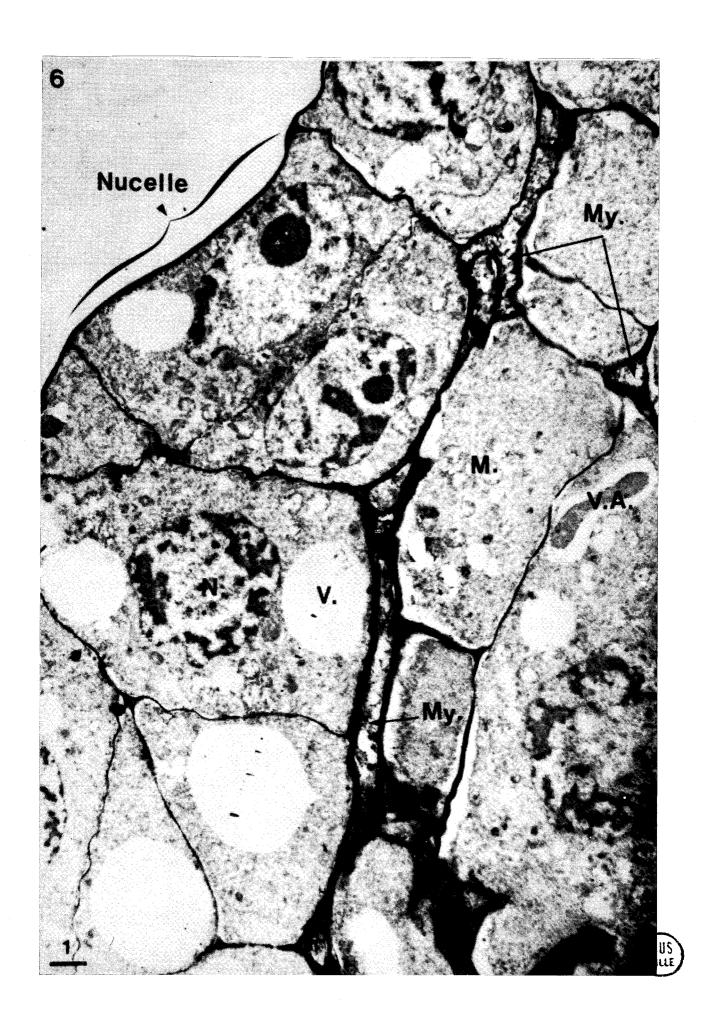


PLANCHE XXVI

JEUNE OVULE PARASITE

TECHNIQUES : M.E.T. : glut/OsO₄ - THIERY, fig. 7.

Fig. 7: Nucelle. Nécrose des cellules nucellaires centrales, au voisinage desquelles se situent de nombreux hyphes du parasite. Les cellules situées à la périphérie de ce massif nécrotique sont hypertrophiées. Le parasite Se comporte ici comme dans les anthères. De nombreuses gouttelettes lipidiques apparaissent aussi bien dans les cellules nécrosées que dans les cellules hypertrophiées.

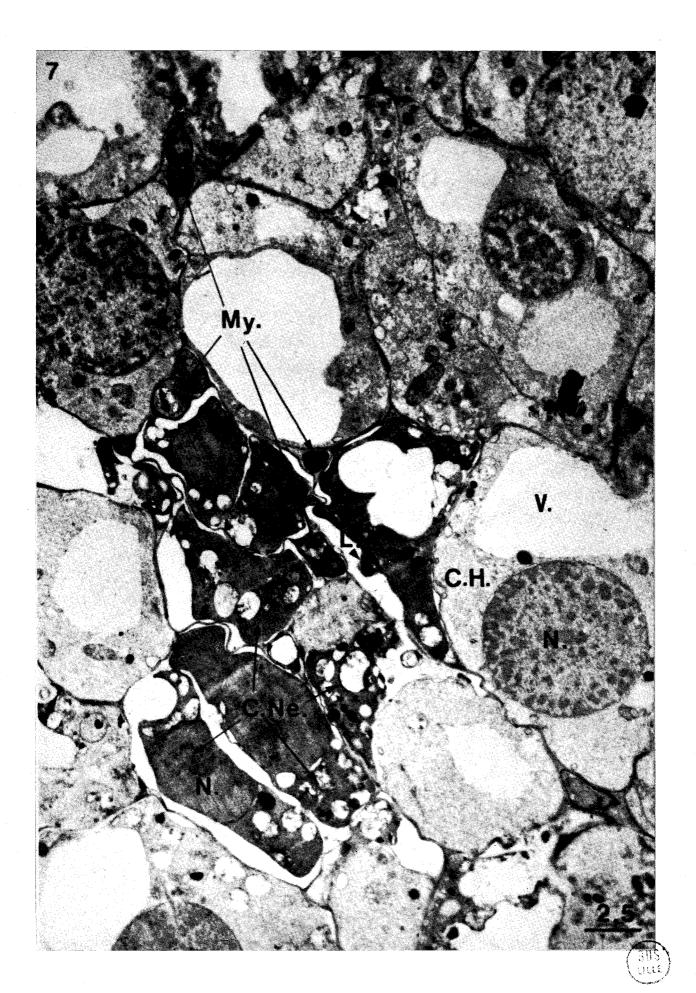


PLANCHE XXVII

JEUNE OVULE PARASITE

TECHNIOUES : M.E.T. : glut/OsO₄ - THIERY, fig. 8.

Fig. 8 : Nucelle. Certaines cellules nucellaires, malgré

la présence du parasite, se multiplient normalement.



PLANCHE XXVIII

OVULES AGES ET PARASITES : SPORULATION DU CHAMPIGNON

TECHNIOUES: M.O. Coupe à la paraffine, bleu de nil ; fig. 9 et
10.
M.E.T.: glut/OsO_A - THIERY, fig. II

Fig. 9 : L'agressivité du parasite se manifeste à partir du centre du nucelle. Le reste des cellules est apparemment normal.

Fig. 10 : L'agressivité envahit tout le nucelle.

<u>Fig. II</u> : Mycélium situé au contact des cellules tégumentaires qui ne souffrent guère de ce voisinage.

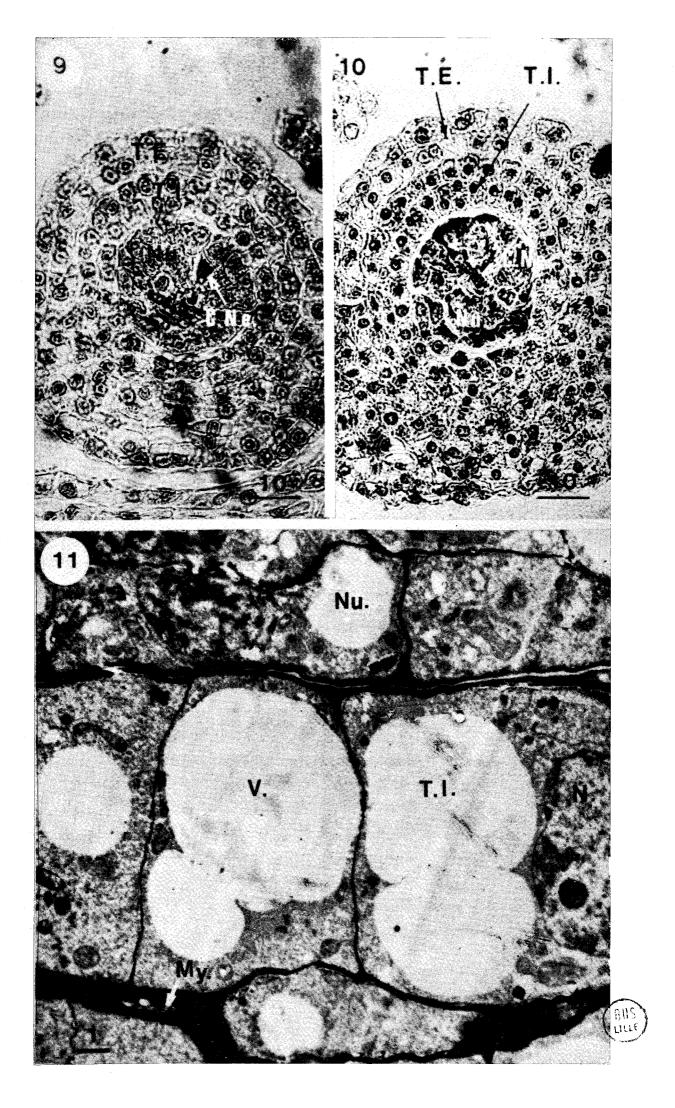


PLANCHE XXIX

SPORULATION DU PARASITE ET CAS PARTICULIER DES OVULES DEGENERES

- TECHNIOUES: M.O. coupe à la paraffine bleu de nil; fig. I2

 Semi-fine, thionine fig. I3

 M.E.T.: glut/OsO, THIERY, fig. I4.
- Fig. I2 : Ovule dont le nucelle est totalement détruit et remplacé par les téliospores du champignon.
- Fig. I3 : Cas particulier d'un ovule dégénéré. Aspect général d'un nucelle dont les cellules sont dépourvues de tout contenu cytoplasmique. Il ne subsiste que les parois cellulaires. Cependant, les effets agressifs du mycélium sont encore localisés au centre du nucelle.
- Fig. 14 : Tégument d'un ovule dégénéré. Les cellules sont très vacuolisées et certains organites sont encore visibles.

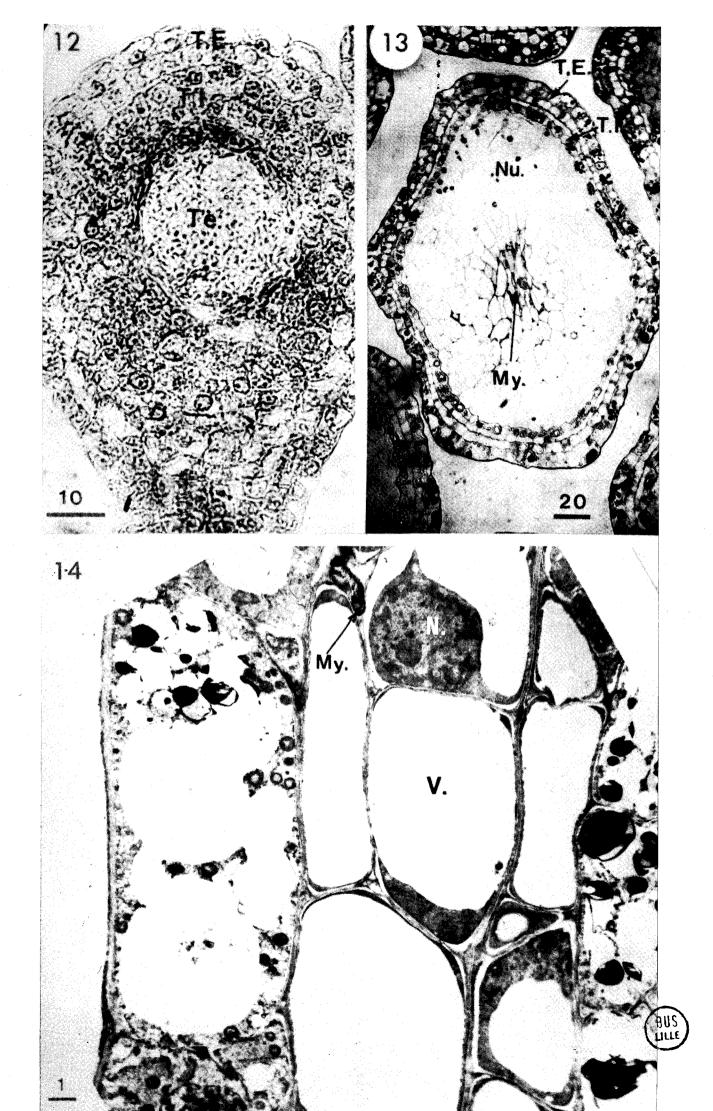


PLANCHE XXX

CAS PARTICULIER D'OVULES DEGENERES

TECHNIOUFS : M.E.T. : glut/0s04

acétate d'uranyle, citrate de plomb. fig. I

Fig. 15

: Nucelle. Détail de cellules entièrement détruites.

Tous les contenus cellulaires sont lysés dans

certaines cellules ; dans d'autres, la présence de

résidus de noyau fortement nécrosé laisse supposer

que c'est l'un des derniers organites à disparaître.

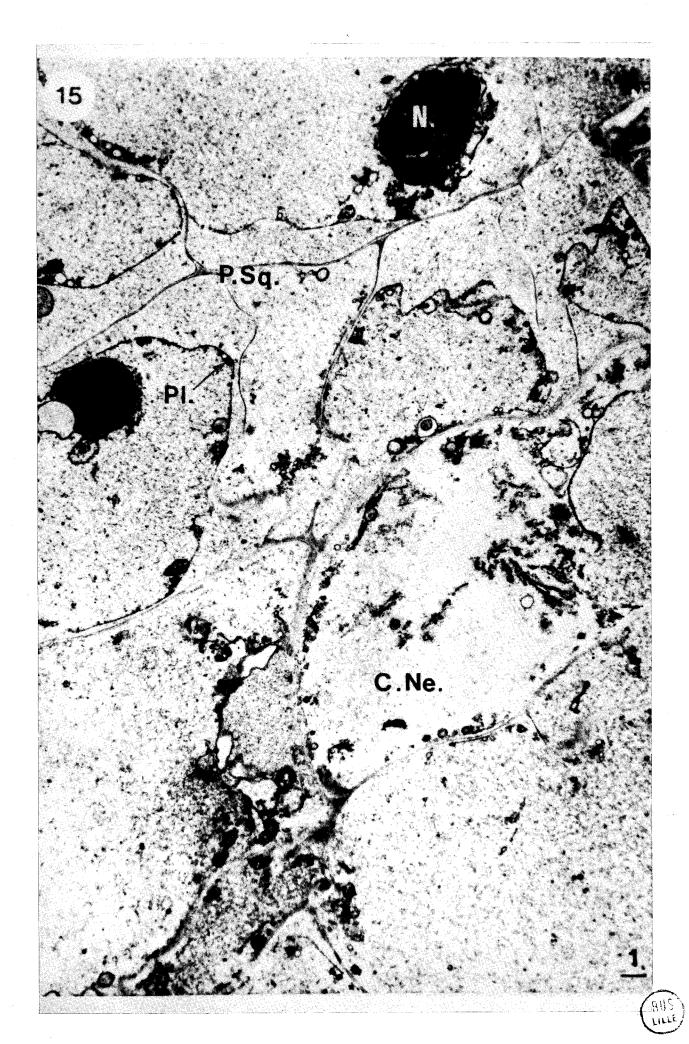


PLANCHE XXXI

CAS PARTICULIER D'OVULES DEGENERES

Fig. 16 : Nucelle. Amas de vésicules résultant de la dégradation du contenu d'une cellule qui ne conserve plus que sa paroi.

Fig. 17 : Nucelle. Le protoplasme des cellules nucellaires est remplacé par une masse granulo-fibrillaire.

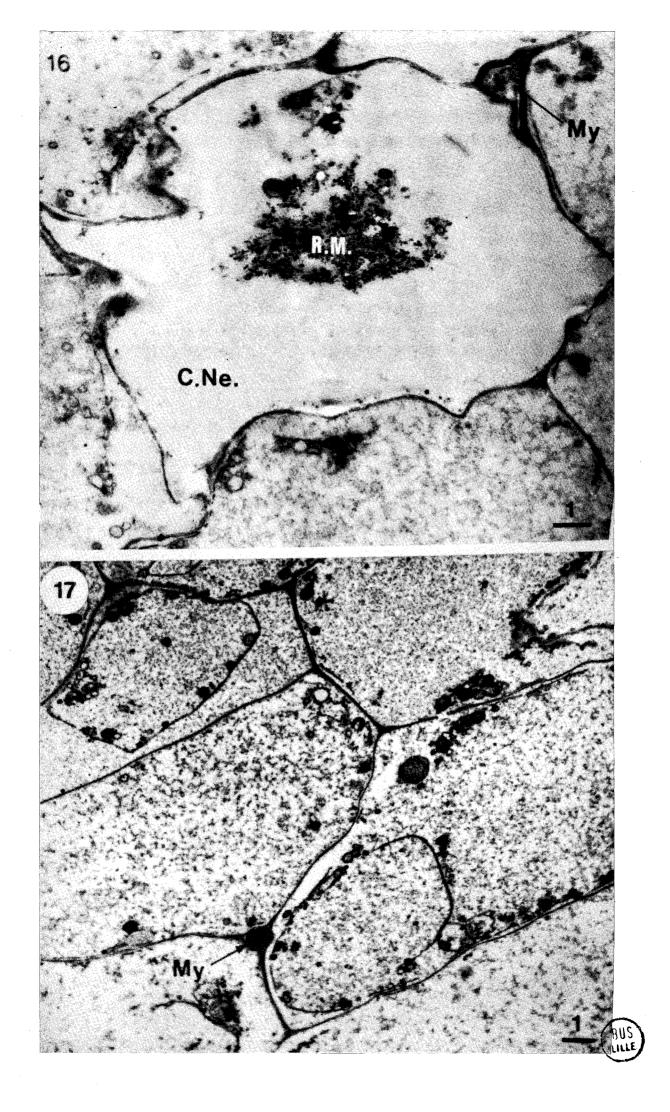


PLANCHE XXXII

POLYSACCHARIDES PARIETAUX ET AMIDON

- TECHNIOUES: M.O. semi-fine; fig. I: A.P.S.; fig. 2: solution iodo-iodurée de Lugol.

 M.E.T.: glut/OsO, THIERY: fig. 3 4.
- Fig. I (x I.000) : Histologie d'un sac pollinique sain.

 Les cellules sporogènes et tapétales ne possèdent pas d'amidon. Les cellules épidermiques, pariétales, tapétales et sporogènes ont des parois squelettiques de nature pectocellulosique, mais d'épaisseur variable.
- Fig. 2 (x 750) : Anthère saine. Répartition de l'amidon.
- Fig. 3 (x II.600): Anthère parasitée. Parois squelettiques d'une cellule sporogène intacte et du mycélium. Au contact du mycélium, la paroi squelettique de la cellule sporogène s'est légèrement épaissie.
- Fig. 4 (x 15.600): Anthère parasitée. Paroi squelettique d'infrastructure normale entre une cellule sporogène nécrosée et une cellule hypertrophiée. Des grains d'amidon intraplastidiaux sont identifiables dans la cellule sporogène nécrosée.

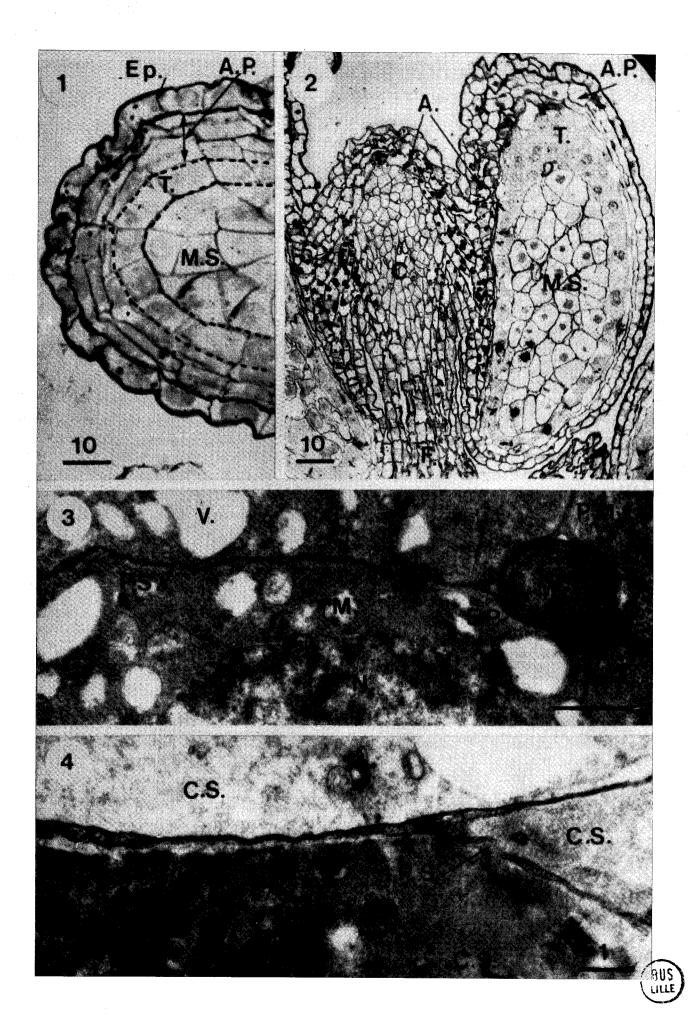


PLANCHE XXXIII

AMYLOGENESE DANS LES CELLULES SPOROGENES NECROSEES ET PAROI MYCELIENNE.

TECHNIOUFS: M.O. semi-fine; fig. 6 - 7 - 8; A.P.S.;
fig. 9: rouge de ruthénium. Fixation par le
liquide de Carnoy - coupe à la paraffine, Bleu
alcian; fig. IO.
M.E.T.: glut/OsO, - THIERY: fig. 5.

- Fig. 5 (x I5.600): Anthère parasitée. Paroi squelettique de cellules sporogènes très dégradées. Des amyloplastes avec des granules amylifères sont présents dans le cytoplasme des cellules sporogènes.
- Fig. 6 (x 750) : Jeune anthère parasitée : le mycélium, au paroi APS +, s'insinue entre les cellules sporogènes dont certaines sont déjà écrasées (flèches doubles). Il n'y a pas d'amidon.
- Fig. 7 (x 750) : Anthère parasitée. Stade plus avancé que celui de la fig. 6. Un plus grand nombre de cellules sporogènes sont écrasées (flèches doubles), et de nombreuses autres sont hypertrophiées (flèches triples).

 Le mycélium dont les parois sont toujours APS +, est plus abondant. Des grains d'amidon apparaissent dans les cellules nécrosées.
- Fig. 8 (x I.500) : Anthère parasitée. Toutes les cellules sporogènes sont nécrosées et renferment de nombreux grains d'amidon. Le mycélium envahit la cavité sporangiale.
- Fig. 9 10 (x 750) : Anthères parasitées. Les parois squelettiques mycéliennes sont colorées par le rouge de ruthénium et le bleu alcian.

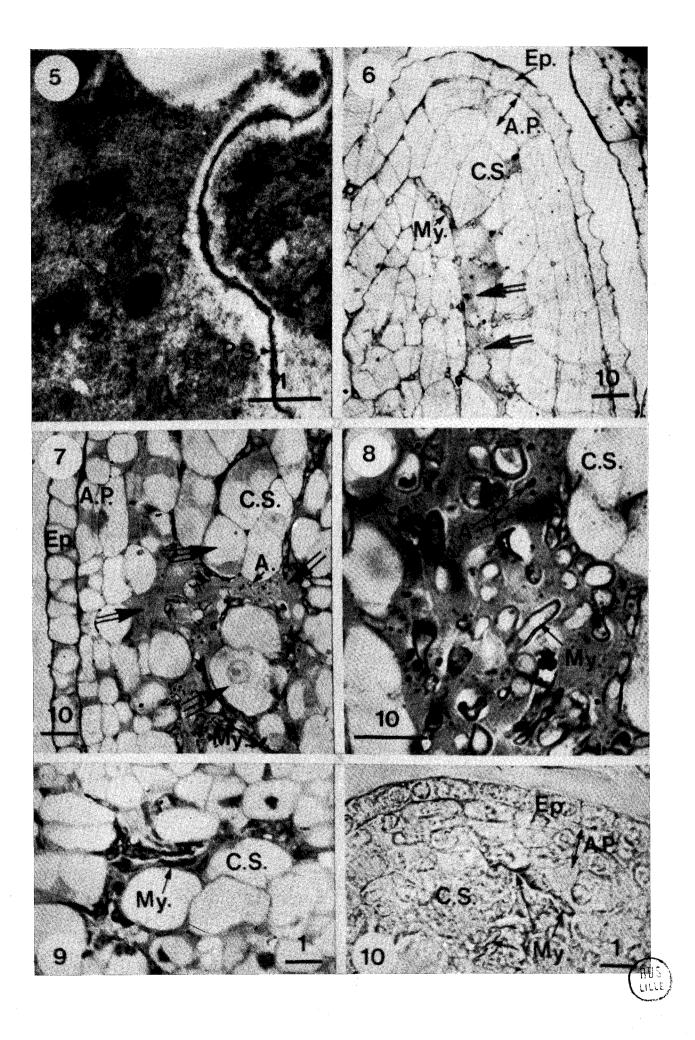


PLANCHE XXXIV

TELIOSPORES, GLYCOGENE ET LIPIDES

- TECHNIOUES: M.O.: semi-fines; fig. II: rouge de ruthénium; fig. I3 I4: noir soudan.
 - M.E.T. : $glut/OsO_4$ THIERY ; fig. I2.
- Fig. II (x 750) : Anthère parasitée. Stade de sporulation du champignon. Futures téliospores à parois épaisses et reste de cellules sporogènes.
- Fig. 12 (x 19.000) : Hyphe mycélien avec glycogène dans le cytoplasme.
- Fig. I3 (x 750) : Jeune anthère parasitée, Les lipides sous forme de gouttelettes sont abondants dans les cellules sporogènes. Les cellules sporogènes nécrosées (double flèche) réagissent fortement avec le noir soudan, tandis que le mycélium ne se teinte que très légèrement.
- Fig. 14 (x 750) : Anthère parasitée. Les hyphes mycéliens sont très colorés par le noir soudan.

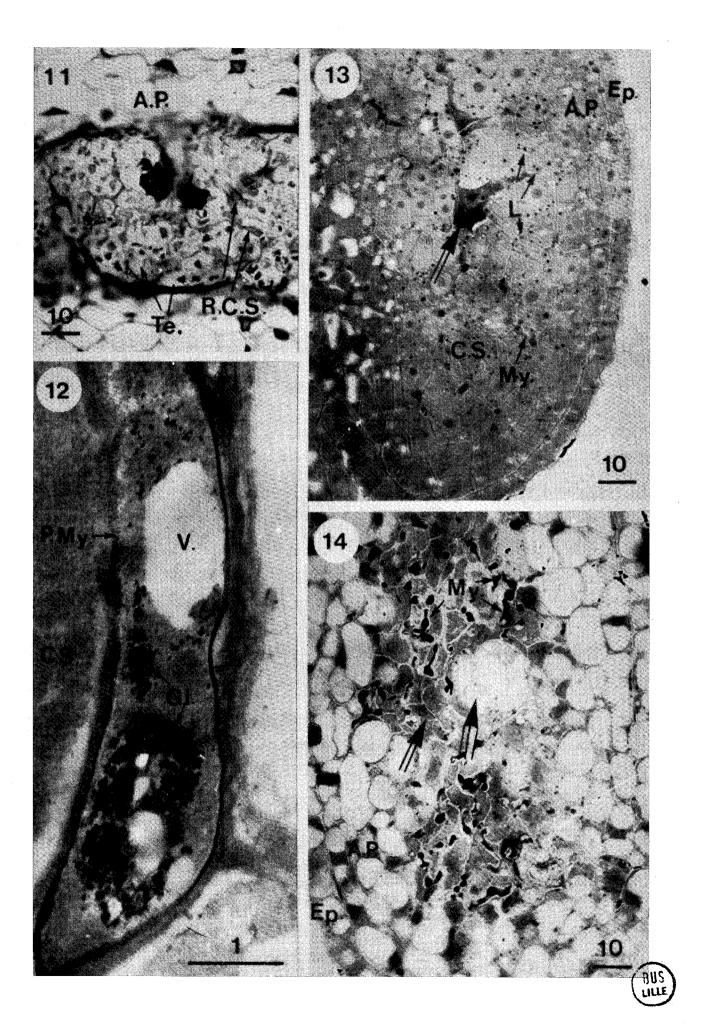


PLANCHE XXXV

LIPIDES SPOROCYTAIRES ET MYCELIENS

- TECHNIQUES : M.E.T. : glut/OsO₄ ; fig. I5 : citrate de plomb et acétate d'uranyle ; fig. I6 : THIERY.
- Fig. 15 (x 8.000): Anthère parasitée. Contre les cellules sporogènes nécrosées apparaissent des amas lipidiques abondants. Dans les hyphes mycéliens, de gros globules lipidiques se développent.
- Fig. 16 (x 18.000): Anthère parasitée. Les globules lipidiques des cellules nécrosées sont rejetés hors de la cellule. Certains viennent au voisinage du mycélium.

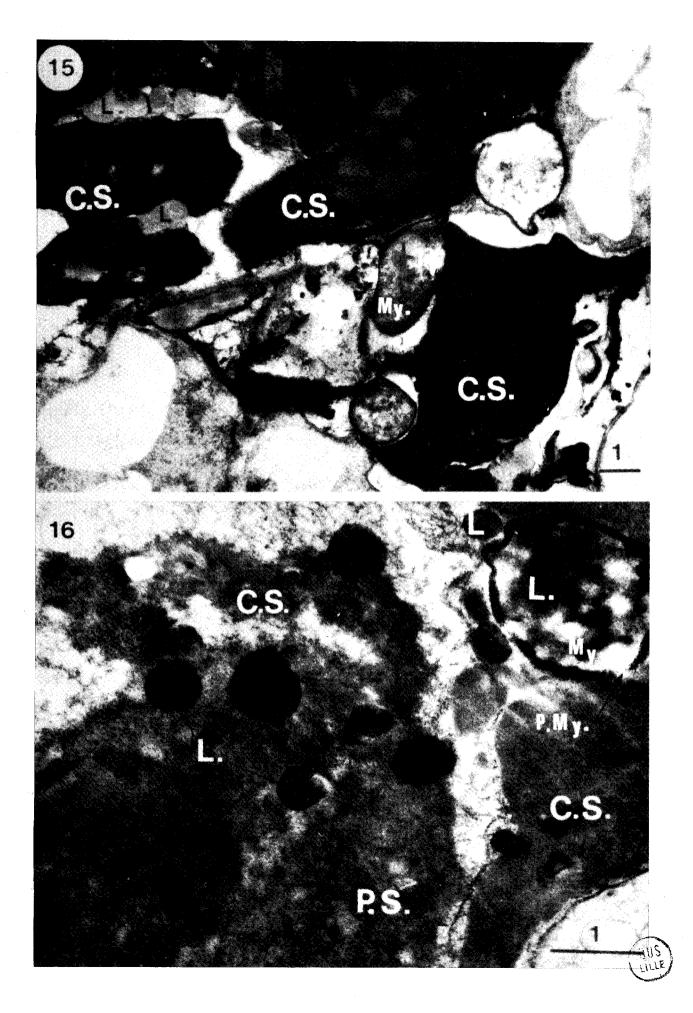


PLANCHE XXXVI

LIPIDES ET PROTEINES

- JECHNIQUES: M.O. semi-fine: fig. I8: bleu de nil.

 Fixation par le liquide de Carnoy; coupe à la paraffine: fig. I9 20 2I: ninhydrine

 M.E.T.: glut/OsO4 THIERRY (fig. I7).
- Fig. 17 (x 18,000) : Anthère parasitée, Rejets lipidiques dans l'espace extracellulaire.
- Fig. 18 (x 1.500) : Anthère parasitée Lipides intramycéliens (flèches).
- Fig. 19 (x 650) : Anthère saine. Réaction homogène à la ninhydrine des différents tissus de l'anthère.
- Fig. 20 2I (x 650) : Anthère parasitée : les cellules nécrosées réagissent fortement à la ninhydrine.

